TRANSPORTMECHANISMEN FÜR K^+, Na^+ UND Cl^- IN STATIONÄREN UND DYNAMISCHEN ZUSTÄNDEN BEI ACETABULARIA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

HOLGER MUMMERT

aus Barmstedt

1979

TRANSPORTMECHANISMEN FÜR K^+, Na^+ UND Cl^- IN STATIONÄREN UND DYNAMISCHEN ZUSTÄNDEN BEI ACETABULARIA

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

HOLGER MUMMERT

aus Barmstedt

1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Tag der mündlichen Prüfung	22.02.1979
Dekan	Professor Dr. F.Oberwinkler
1. Berichterstatter	Privatdozent Dr. D.Gradmann
2. Berichterstatter	Professor Dr. A.Hager

Je älter man wird,
desto weniger Leute gibt es,
die im gleichen Alter
auch noch nichts Besonderes waren.

(Autor unbekannt)

Inhalt Seite

1	Einleitung	1
2	Erklärung häufig verwendeter Symbole und Abkürzungen	3
3	Material und Methoden	5
3.1	Versuchsobjekt	5
3.2	Anzucht	5
3.3	Versuchsmedium	6
3.4	Vorinkubation	6
3.5	Elektrische Messungen	7
3.6	Flußmessungen	9
3.6.1	Aufbau und Durchführung von Flußexperimenten	9
3.6.2	Efflux	12
3.6.2.1	Efflux radioaktiv markierter Ionen ...	12
3.6.2.2	Efflux von Protonen	13
3.6.3	Influx	13
3.7	Radioaktivitätsmessungen	15
3.8	Zentrifugierte Zellen	16
3.9	Präparation von Acetabularia-Zellwänden	19
4	Vorversuche	19
4.1	Rb^+ als Ersatz für K^+	19
4.2	$^{86}Rb^+$ als Tracer für K^+ bei Acetabularia	23
5	Ergebnisse	24
5.1	Stationäre Zustände	24
5.1.1	Influx	24

5.1.1.1	Influx von $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 21°C	24
5.1.1.2	Influx von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 4°C ...	30
5.1.2	Efflux	38
5.1.2.1	Formale Behandlung	38
5.1.2.2	Efflux von $^{42}K^+$ bei Normaltemperatur (21°C)	40
5.1.2.2.1	Zuordnung der Efflux-Komponenten	40
5.1.2.2.2	Abgabe von $^{86}Rb^+$ aus Acetabularia-Zellwänden	43
5.1.2.2.3	$^{42}K^+$- Efflux-Kinetiken mit Versetzungen	45
5.1.2.3	Efflux von $^{22}Na^+$ bei Normaltemperatur (21°C)	47
5.1.2.3.1	Vergleich mit Influxdaten	47
5.1.2.3.2	Fallunterscheidung	48
5.1.2.3.3	Anwendbarkeit der konventionellen Kompartimentsanalyse auf den $^{22}Na^+$-Efflux bei Acetabularia	49
5.1.2.3.4	Ergebnisse der $^{22}Na^+$-Effluxmessungen .	54
5.1.2.3.5	$^{22}Na^+$-Efflux von nicht-vakuolisierten Zell-"Stummeln"	56
5.1.2.3.6	Chloroplasten als Flußkompartiment ...	57
5.1.2.3.7	Vergleich: Cytoplasma - Vakuole	58
5.1.2.4	Efflux von $^{36}Cl^-$ bei Normaltemperatur (21°C)	59
5.1.2.4.1	$^{36}Cl^-$-Efflux von nicht-vakuolisierten Zell-"Stummeln" und cytoplasmafreien Zell-"Schläuchen"	62

5.1.2.5	Efflux von $^{22}Na^+$ bei 4°C	65
5.1.2.5.1	Vergleich des $^{22}Na^+$-Efflux bei 4° und bei 21°; 2-phasige Effluxkinetiken ...	65
5.1.2.5.2	1-phasige Efflux-Kinetiken	67
5.1.2.5.3	$^{22}Na^+$-Abgabe nach kurzen Inkubationszeiten, ($t_{in} \leq \tau_2$)	67
5.1.2.6	Efflux von $^{36}Cl^-$ bei 4°C	70
5.1.2.6.1	Vergleich des $^{36}Cl^-$-Efflux bei 4° und bei 21°	70
5.1.2.6.2	$^{36}Cl^-$ - Efflux-Kinetiken mit "Schulter"	71
5.2	Dynamische Zustände	75
5.2.1	Spannungsabhängiger $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux .	75
5.2.1.1	$K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe lichtinduzierter Änderungen des Membranpotentials	75
5.2.1.2	"Feinstruktur" des $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe eines Aktionspotentials ..	77
5.2.1.3	$K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe spontaner und strominduzierter Änderungen der Membranspannung	79
5.2.2	$^{22}Na^+$-Efflux mit simultaner Messung der Membranspannung	82
5.2.2.1	Normalzellen	82
5.2.2.2	Nicht-vakuolisierte Zell-"Stummel" ...	86
5.2.3	$^{36}Cl^-$-Efflux mit simultaner Messung der Membranspannung	87
5.2.3.1	Normalzellen; Phänomene	87
5.2.3.2	Nicht-vakuolisierte Zell-"Stummel" ...	92
5.2.3.3	Cytoplasmafreie Zell-"Schläuche"	97

5.2.3.4	Quantitative Beziehungen zwischen $^{36}Cl^-$- Efflux und Membranspannung; Normalzellen	99
5.2.3.5	Quantitative Beziehungen zwischen $^{36}Cl^-$-Efflux und Membranspannung; "Stummel" und "Schläuche"	102
5.2.4	Protonen-Efflux mit simultaner Messung der Membranspannung	104
6	Diskussion	106
6.1	Abschätzung der relativen Volumina der Zellkompartimente Cytoplasma und Vakuole	106
6.2	Transportmechanismen für K^+, Na^+ und Cl^-	110
6.2.1	Allgemeine Betrachtung	110
6.2.2	Transportmechanismen bei 4°C	114
6.2.3	Transportmechanismen bei Normaltemperatur (21°C)	118
6.2.3.1	Transport von K^+	118
6.2.3.2	Transport von Na^+.....	119
6.2.3.2.1	Problemstellung	119
6.2.3.2.2	Abweichungen vom "In-Serie"-Modell; Flußanalysen	120
6.2.3.2.3	Vergleich: Normalzellen - Zell-"Stummel"; $^{22}Na^+$, $^{36}Cl^-$	123
6.2.3.3	Transport von Cl^-	125
6.2.3.3.1	Problemstellung	125
6.2.3.3.2	Vergleich: Normalzellen - Zell-"Stummel" - Zell-"Schläuche"	126
6.2.3.3.3	Transportmechanismus für die schnelle Cl^--Effluxkomponente 2	128
6.2.3.3.4	Transportmechanismus für die Komponente 3 des Cl^--Efflux	131

6.3 Spannungsabhängiger Cl^--Efflux im Verlaufe von Aktionspotentialen ... 133

6.4 Quantitative Behandlung von Vesikeltransport 136

7 Zusammenfassung 138

8 Literatur 140

1 Einleitung

Der Transport von Ionen durch biologische Membranen wird seit einigen Jahren zunehmend auf dem Niveau der Einzelzelle erforscht (Übersicht bei 2, 3, 4). Im Vordergrund stehen dabei zwei Ansätze: Einerseits die Untersuchungen des passiven oder aktiven Ionendurchtritts durch Membranen mit Hilfe radioaktiver Isotopenmarkierung. Andererseits die Anwendung elektrophysiologischer Meßmethoden zur Bestimmung elektrischer Membranparameter, wie z.B. Membranwiderstand, Membrankapazität oder Membranspannung in Gleichgewichts- und Übergangszuständen.

Diese unterschiedlichen methodischen Ansätze wurden bei der einzelligen marinen Grünalge Acetabularia mediterranea bereits erfolgreich kombiniert angewendet [20,30]. Deshalb lag es nahe, diese Technik auszubauen und an dieser Einzelzelle Ionenflüsse und elektrische Parameter simultan zu messen.

Acetabularia bringt dafür besonders günstige Voraussetzungen mit. Die interessante Elektrophysiologie dieser Alge (z.B. elektrogene Cl^--Pumpe, Auftreten von Aktionspotentialen mit einer Dauer von 1 - 3 min) ist inzwischen gut untersucht [36,13,37,17,18,14,15,19,1,16]. Zudem bietet Acetabularia wegen ihrer für einen Einzeller respektablen Größe (bis 5 cm lang, bei einem Durchmesser von 0,3 - 0,1 mm) gute Voraussetzungen für die Anwendung der Tracer-Fluß-Analyse auf eine einzelne Zelle. Die

bisher veröffentlichten Ergebnisse von Ionenflußmessungen an Acetabularia [34,35,20,12,30] sind allerdings zum Teil widersprüchlich.

Aus diesem Grunde bechäftigt sich der erste Teil der vorliegenden Arbeit mit den Ergebnissen von Ionenfluß-messungen in Gleichgewichtszuständen; einmal bei Normaltemperatur (21°C) und andererseits in der Kälte (4°C), wenn aktive Prozesse gehemmt sind.
Der zweite Teil der Arbeit beinhaltet die Ergebnisse, die mit Hilfe verfeinerter Techniken zur simultanen Messung von Ionenflüssen und elektrischen Parametern in stationären und dynamischen Zuständen gewonnen wurden.

Die kombinierten Ergebnisse beider Ansätze ermöglichen es, ein Bild der Ionentransportmechanismen für K^+, Na^+ und Cl^- bei Acetabularia zu entwerfen, auf dessen Grund-lage die Leistung verschiedener Transportmechanismen, sowie ihre Abhängigkeit von verschiedenen Parametern wie Temperatur, Licht oder Membranspannung diskutiert werden.

2 Erklärung häufig verwendeter Symbole und Abkürzungen

Bezeichnung	Erläuterung	Dimension
A	Fläche	m^2
A^*_0	Ausgangsradioaktivität	cpm,dpm
A^*_t	Radioaktivität zur Zeit t	cpm,dpm
A^*_∞	Radioaktivität zur Zeit t = ∞	cpm,dpm
AP	Aktionspotential	
c	Konzentration	M
E_D	Diffusionspotential	V
E_j	Gleichgewichtspotential für das Ion j	V
E_K	Gleichgewichtspotential für K^+	V
E_P	Elektromotorische Kraft der elektrogenen Pumpe	V
g_j	Membranleitfähigkeit für das Ion j	$S\ m^{-2}$
HWZ	Halbwertszeit für den radioaktiven Zerfall	h,d
i	"Innen"	
I_P	Strom durch die elektrogene Pumpe	$A\ m^{-2}$
k	Reaktionskonstante	s^{-1}
K-1,2,3	Komponente 1,2,3 der Flußkinetik	
KSW	Künstliches Seewasser	
NT	Normaltemperatur (21°C)	°C

Bezeichnung	Erläuterung	Dimension
NZ	Normalzelle	
o	"Außen"	
P_j	Membranpermeabilität für das Ion j	$m\ s^{-1}$
Φ	Ionenflux	$Mol\ m^{-2}s^{-1}$
RP	Ruhepotential	V
S^*_o	Radioaktive Spezifität im Außenmedium	cpm,dpm Mol^-
S^*_Z	Radioaktive Spezifität in der Zelle	cpm,dpm Mol^-
SH	"Schlauch", (Def.:3.8)	
ST	"Stummel" , (Def.:3.8)	
t	Zeit	s,min,h
T	Temperatur	^oC
t1/2	Halbwertszeit der Ionenaufnahme oder Abgabe	min,h
t_{in}	Dauer der Inkubation mit radioaktiv markierten Ionen	min,h
τ	Zeitkonstante	min,h
V_m	Membranspannung	V
$\bar{x}$	Mittelwert	

3 Material und Methoden

3.1 Versuchsobjekt

Acetabularia mediterranea ist eine einzellige, marine Grünalge aus der Familie der Dasycladaceen (Siphonales). Wegen der annähernd zylindrischen Geometrie wurden nur solche Algen verwendet, die noch nicht den für ausgewachsene Zellen typischen Hut gebildet hatten. Dadurch ließen sich Oberfläche und Volumen leichter berechnen. Die verwendeten Algen waren 15 - 35 mm lang und hatten einen Durchmesser von 0,2 - 0,4 mm.

3.2 Anzucht

Die Anzucht von Acetabularia erfolgte in Erdschreiber-Kulturmedium [5,22]. Dieses Anzuchtmedium ließ sich nicht mit definierter Zusammensetzung herstellen, da es neben natürlichem Seewasser auch Erdekokt unbekannter Zusammensetzung enthält.

Die Algen wurden in einem Konstantraum bei 21 ± 1°C und Weißlicht (Mischlicht: Osram 40W/15 Daylight und Osram L 40W/25 Universal White) von 12 W m^{-2} im LD 12 : 12 h gehalten. Um eine Verpilzung der Kulturen zu verhindern, wurde das Kulturmedium alle 10 - 16 Tage erneuert.

Die verwendeten Algen stammten aus Kulturen, die seit mehr als 10 Jahren unter Kulturbedingungen im Institut für Biologie I der Universität Tübingen gehalten werden.

3.3 Versuchsmedium

Künstliches Seewasser (KSW) diente in den meisten Fällen als Versuchs- und Auswaschmedium. Im Gegensatz zum Anzuchtmedium ist die Zusammensetzung des Versuchsmediums bekannt: 461 mM Na^+, 10 mM K^+, 53 mM Mg^{++}, 10 mM Ca^{++}, 529 mM Cl^-, 28 mM SO_4^{--}, 2 mM HCO_3^-, 10 mM Tris/HCl-Puffer, pH 8,0.

Für die radioaktive Markierung wurde jeweils ein Teil ($5 \cdot 10^{-2}$ - 10^{-4}%) der unmarkierten Ionen durch entsprechende radioaktive Nuklide ($^{42}K^+$, $^{86}Rb^+$, $^{22}Na^+$, $^{36}Cl^-$; Amersham-Buchler) ersetzt, sodaß die Gesamtzusammensetzung des Mediums unverändert blieb.

An radioaktiven Aktivitäten wurden eingesetzt: $^{42}K^+$: 130 Ci m^{-3} $^{86}Rb^+$: 200 - 500 Ci m^{-3}, $^{22}Na^+$: 20 - 60 Ci m^{-3}, und $^{36}Cl^-$: 20 - 60 Ci m^{-3}.

Das Radionuklid $^{86}Rb^+$ (HWZ 18,7 d) wurde als Tracer für K^+ bei Effluxexperimenten mit simultaner Messung der Membranspannung an Stelle des kurzlebigen Kaliumisotops $^{42}K^+$ (HWZ 12,4 h) eingesetzt. So war es möglich, ausreichend hohe Radioaktivitätskonzentrationen in der Zelle zu erreichen, sodaß auch die während der kürzesten Efflux-Meßintervalle von 15 s abgegebene Radioaktivitätsmenge noch bequem nachzuweisen war.

3.4 Vorinkubation

Um die Algen mit dem Versuchsmedium zu equilibrieren, wurden sie mindestens 3 Tage vor jedem Experiment in KSW

umgesetzt. Dauerlicht (3,2 W m^{-2}, Osram L 65W/30) sollte eventuelle tagesperiodische Einflüsse weitgehend ausschalten. Die Temperatur betrug während der Vorinkubation ebenso wie bei der Anzucht 21 ± 1°C. Für die Experimente in der Kälte (4°C) wurden alle Arbeitsgänge, von der Vorinkubation über die radioaktive Markierung bis zum Auswaschen in einer Kühlkammer (4 ± 0,5°C) durchgeführt.

3.5 Elektrische Messungen

Die Membranpotentialmessungen erfolgten intrazellulär mit konventioneller Glasmikroelektrodentechnik. Die selbst angefertigten Mikroglaspipetten (Vertical Pipette Puller 700 C, David Kopf Instruments; Borsilikatglas mit eingeschmolzenem Filament, Hilgenberg) mit einem Spitzendurchmesser von weniger als 1 µm (Meßelektroden, Spitzenwiderstand 10^6 - 10^8 Ohm) wurden mit 3 M KCl - Lösung als Elektrolyt gefüllt. In diese - verdunkelte - Lösung tauchte ein chlorierter Silberdraht als differente Ableitelektrode. Die symmetrisch gebauten, niederohmigen Referenzelektroden (Spitzenwiderstand ca. 10^4 Ohm, Spitzendurchmesser ca. 100 µm) waren abgebrochene, mit 1%igem 3 M KCl-Agar gefüllte Glasmikropipetten, ebenfalls mit einer Ag/AgCl - Ableitelektrode.

Die Potentialdifferenz zwischen der mit Hilfe eines Mikromanipulators (Leitz, Wetzlar) in die Zelle eingeführten Meßelektrode (Abb.1, ME) und der in das umgebende Versuchsmedium eintauchenden Referenzelektrode (Abb.1, RE)

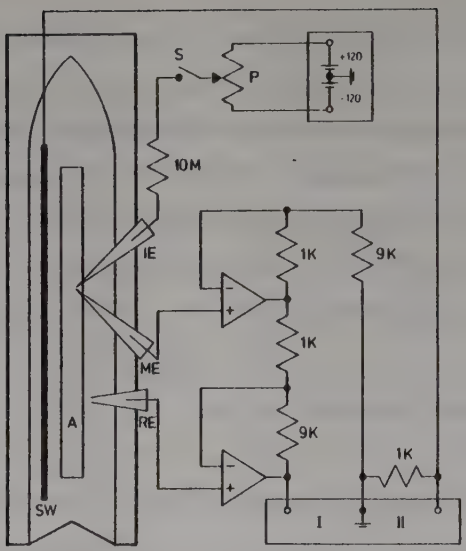


Abb. 1 : Schaltplan der Meßanordnung

A:Alge im Versuchsmedium, IE:stromzuführende Elektrode, ME:Meßelektrode, P:Potentiometer, RE:Referenzelektrode, S:Schalter, SW:stromabführende Silberelektrode, I und II:Spannungsregistrierung

wurde über einen Differenzverstärker (Eingangswiderstand mind. 10^{11}Ohm, Verstärkung 10:1) oder ein Elektrometer (Keithley 610 C, Eingangswiderstand 10^{14}Ohm, Verstärkung 1:1) verstärkt. Ein Linienschreiber (Linseis LS-200 bzw. Phillips PM 8202) diente zur Aufzeichnung des Spannungsverlaufes. Der Schaltplan der Meßanordnung ist in Abb.1 wiedergegeben.

Mittels einer zweiten in die Zelle eingeführten Glasmikroelektrode konnten mit einem Handschalter hinreichend rechteckige de- oder hyperpolarisierende Strompulse (bis 12 µA) appliziert werden, die von einer steuerbaren Gleichspannungsquelle (max. ± 120 V; Philbrick Researches PRH-60) über einen 10 MΩ-Widerstand erzeugt wurden. Über einen parallel zur Alge im Versuchsmedium liegenden Silberdraht wurden die eingespeisten Strompulse weitergeleitet und auf einen Linienschreiber gegeben, dessen Eingang über 1 kΩ geerdet war. Der Spannungsabfall über diesem Widerstand wurde als Maß für den applizierten Strompuls aufgezeichnet (1 mV $\hat{=}$ 1 µA).

3.6 Flußmessungen

3.6.1 Aufbau und Durchführung von Flußexperimenten

Alle Flußexperimente wurden auf einer Tropfapparatur durchgeführt, wie sie in Abb.2 dargestellt ist. Nach der Inkubation mit radioaktiven Isotopen wurde je eine Zelle in die befeuchtete Rinne der Tropfapparatur eingelegt. Bei Effluxexperimenten mit simultaner Spannungsmessung wurden die Glasmikroelektroden bereits zu diesem Zeitpunkt des Versuches in die Zellen eingeführt. Nach dem Öffnen des Mediumzulaufs floß das Auswaschmedium (KSW) über die Alge und tropfte in Intervallen von ca. 3 s ($\hat{=}$ Durchfluß ca. 1 ml min^{-1}) in Szintillationsfläschchen

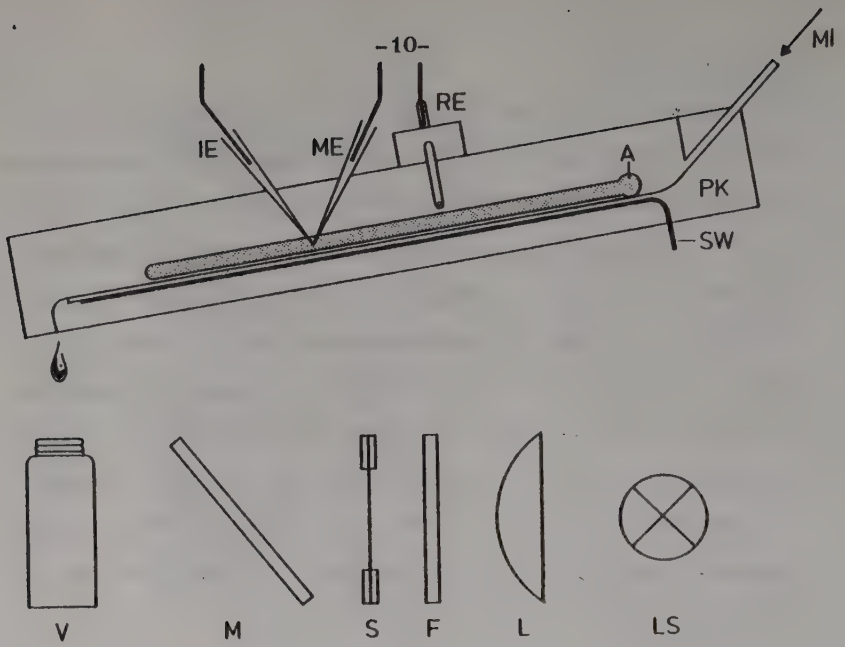


Abb. 2 : Effluxapparatur (halbschematisch)

A:Alge im Versuchsmedium, F:Wärmeschutzfilter, IE:stromzuführende Elektrode, L:Linse, LS:Lichtquelle, M:Spiegel, ME:Meßelektrode, MI:Mediumzufluß, PK:Plexiglasküvette, RE:Referenzelektrode, S:Verschluß, SW:stromabführende Silberelektrode, V:Szintillationsgläschen

(aus Glas oder Polyäthylen, bzw. Reagenzgläser für Messungen der γ-Radioaktivität). Die Totzeit dieser Tropfapparatur betrug bei einer Tropfgeschwindigkeit von ca. 20 Tropfen min^{-1} 3 - 5 s (Abweichung < 3%; bestimmt mit radioaktiver Markierung). Die Halbwertszeit der leeren Apparatur (ohne Alge) beträgt ca. 3 s. Die Tropfintervalle waren relativ konstant. Ein Nachlassen der Tropfgeschwindigkeit durch Absinken des Flüssigkeitsspiegels im Mediumvorratsgefäß (Mediumzulauf nach Saugheberprinzip) war für die Messungen unerheblich und wurde durch entsprechendes Anheben des Mediumvorrats-

gefäßes ausgeglichen. Außerdem war durch große Mediumvorratsgefäße gewährleistet, daß sich der Flüssigkeitsspiegel bei den geringen ausfließenden Mengen kaum veränderte.

Alle Teile der Efflux-Apparatur und das Auswaschmedium hatten immer Umgebungstemperatur (21 ± 1°C bei Experimenten unter Normaltemperatur, bzw. 4 ± 0,5°C bei Experimenten in der Kälte).

Als Lichtquelle diente eine Quarzjodid-Lampe (Wild Heerbrugg) mit vorgeschaltetem KG-1 Filter (Schott, Mainz) als Wärmeschutz. Das Licht wurde mit einer Linse über einen Spiegel von unten auf die Alge in der glasklaren Efflux-Apparatur fokussiert. Bei der größtmöglichen Spannung des Lampen-Regeltransformators wurde so am Ort der Alge eine Lichtintensität von 78 W m^{-2} erreicht (gemessen mit einem Optometer UDT 400). Das Licht konnte durch einen Verschluß innerhalb von höchstens 0,02 s an- und ausgeschaltet werden. Dabei blieb die am Lampenregeltrafo eingestellte Spannung unverändert, um eine gleichbleibende spektrale Zusammensetzung des Lichtes zu gewährleisten. Die Lichtintensität in den Dunkelphasen war mit maximal 10^{-3} W m^{-2} am Ort der Alge (diffuses Streulicht) fast um den Faktor 10^5 kleiner.

3.6.2 Efflux

3.6.2.1 Efflux radioaktiv markierter Ionen

Die Methode der Kompartimentsanalyse ist ausführlich von [8,23,24] beschrieben. Hier soll knapp das Meßprinzip dargestellt werden.

Mit radioaktiven Ionen markierte Zellen wurden auf einer Efflux-Apparatur (Abb. 2) mit nicht radioaktivem KSW ausgewaschen. Die dabei von der Zelle abgegebene Radioaktivität wurde in unterschiedlichen Intervallen (15 s bis 10 min) in Szintillationsfläschchen gesammelt. Anschließend wurde die Radioaktivität der einzelnen Proben bestimmt, sowie die zu Ende des Versuches noch in der Zelle verbliebene Radioaktivität (Radioaktivitätsmessungen siehe 3.7).

Durch Summation der abgegebenen Radioaktivität erhält man den Radioaktivitätsgehalt in der Zelle für jeden Meßpunkt des Auswaschexperimentes. Logarithmisches Auftragen der Aktivität in der Zelle (log cpm oder log dpm in der Zelle) gegen die Zeit nach Beginn des Auswaschens ergibt die graphische Darstellung einer Efflux-Kinetik (Beispiel siehe Abb. 12). Für ein 2-Kompartiment-System in Serie ist diese Efflux-Kinetik zunächst nicht linear, geht dann aber in eine Gerade über. Durch ein Subtraktionsverfahren [8,23,24] läßt sich diese Darstellung einer Efflux-Kinetik graphisch

in mehrere, in halblogarithmischer Darstellung lineare Komponenten (i.d.R. 3 Komponenten) zerlegen, die die Auswaschung einzelner Flußkomponenten wiedergeben.

Bei Efflux-Versuchen mit simultaner Messung der Membranspannung wurde der Zeitpunkt des Vorlagenwechsels auf dem Spannungsschreiber markiert. Die Berechnungen des Zusammenhanges zwischen Efflux und Membranspannung (5.2) sind für die Totzeit der Effluxapparatur (ca. 5 s) korrigiert.

3.6.2.2 Efflux von Protonen

Die Versuchsanordnung entsprach im Prinzip der der Tracer-Auswaschexperimente (3.6.1). Der pH des Mediums (1/10 Tris/HCl-gepuffertes KSW, pH 6-9) wurde nach dem Auswaschen kontinuierlich registriert (pH-Meter, Knick; angeschlossen an Linienschreiber). Die Meßanordnung war in der Lage, bei 0,2 ml Meßvolumen Änderungen von mindestens 1 pMol H^+ (oder Äquivalenten) zu erfassen, entsprechend einem Protonen-Efflux von 1 - 2 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$.

3.6.3 Influx

Zur Messung der Ionenaufnahme von Zellen mittels radioaktiver Isotope bieten sich grundsätzlich zwei Methoden an.
Methode 1: Die Zellen werden nach unterschiedlich langer

Inkubation mit dem radioaktiven Isotop auf der Efflux-Apparatur mit nicht radioaktiv markiertem KSW ausgewaschen. Nach der unter 3.6.2.1 beschriebenen Methode wird graphisch eine Efflux-Kinetik erstellt, und die Radioaktivität in den einzelnen Komponenten ermittelt. Der Influx der Ionen läßt sich als Anstieg der radioaktiven Spezifität (cpm Mol^{-1}) in der Zelle (oder in den einzelnen Komponenten) in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer graphisch darstellen (Beispiel Abb. 7).

Unter der üblichen Voraussetzung, daß ein Isotopie-Effekt (die Zelle unterscheidet nicht zwischen radioaktiven und nicht-radioaktiven Isotopen eines Ions) nicht auftritt, oder vernachlässigbar klein ist, kann die radioaktive Spezifität in der Zelle die des Außenmediums nicht übersteigen.

Methode 2: Ist die Zeitkonstante der Auswaschung des Zellwand-free-space ermittelt (siehe 5.1.2.2.2),und ist diese etwa um den Faktor 5 - 10 kleiner als die des schnellsten Protoplastenkompartimentes, kann man nach der Inkubation mit radioaktiv markierten Ionen den Zellwand-free-space auswaschen (Dauer ca. 3 x τ free-space),ohne daß der Protoplast während dieser Zeit nennenswerte Mengen an Radioaktivität verliert. Anschließend wird die im Protoplasten verbliebene Radioaktivität bestimmt.

Wenn nicht anders angegeben, wurde für Aufladezeiten

> 1 h immer Methode 1 angewendet. Diese hat zudem den Vorteil, wesentlich mehr Information zu liefern (Anzahl der Kompartimente, Zeitkonstanten der Auswaschung, Radioaktivitätsgehalt der einzelnen Kompartimente) als Methode 2.

3.7 Radioaktivitätsmessungen

Die Bestimmung der β-Radioaktivität ($^{42}K^+$, $^{86}Rb^+$, $^{36}Cl^-$) erfolgte nach der Flüssigkeitsszintillations-Meßmethode. Als Szintillatorflüssigkeit wurde Unisolve-1 (Koch-Light Laboratories) verwendet. Der größte Teil der Messungen wurde mit einem Packard Tri-Carb Liquid Scintillation Spectrometer 3385 durchgeführt, ein kleiner Teil, v.a. die Messungen von $^{86}Rb^+$, auch mit einem Beckmann LS-233 LSC. Quenchkorrekturen erfolgten nach der Methode des internen Standards. Für den harten β-Strahler $^{86}Rb^+$ (Zerfallsenergie 17,8 MeV) erübrigten sich Quenchkorrekturen. In diesem Fall waren cpm = dpm. Die Berechnungen der Ionenflüsse sind für die Halbwertszeit der radioaktiven Isotope korrigiert.

Für die Messungen der γ-Radioaktivität stand ein Packard Auto Gamma Scintillation Spectrometer 5230 zur Verfügung. Bei den $^{22}Na^+$-Effluxmessungen mit simultaner Spannungsmessung reichte die Ausbeute auf diesem Gerät (ca. 18%) für die in den kurzen Meßintervallen (bis 15 s) anfallenden geringen Radioaktivitätsmengen nicht aus. Die Aktivität dieser Proben wurde daher mit einer selbst entwickelten Methode bestimmt.

Die abgegebene γ-Radioaktivität wurde in Szintillationsfläschchen (Packard, Polyäthylen) gesammelt, mit Unisolve-1 (1:1) versetzt und in einem Szintillationszähler (Packard 3385) bei einer Fenstereinstellung von 20 - 600 mit einer Verstärkung von 4% gemessen. Die Ausbeute lag mit dieser Methode ausreichend hoch bei ca. 60%. Die Messungen waren über einen Bereich von 0 bis 10^5 cpm linear.

Die Grundlage für diese Meßmethode könnte der Compton-Effekt sein. Dabei werden durch Absorption der γ-Quanten Elektronen ("Compton-Elektronen") freigesetzt. Zudem entstehen bei diesem Vorgang weitere, weniger energiereiche γ-Quanten, die wiederum absorbiert werden können und dabei ebenfalls Elektronen ("Photo-Elektronen") freisetzen . Die bei diesen Vorgängen entstandenen Elektronen wirken dann auf das Szintillatorensystem wie die β-Elektronen und können wie diese mit dem Szintillationszähler gemessen werden.

3.8 Zentrifugierte Zellen

Werden ganze Acetabularia-Zellen in einer Haltevorrichtung (Abb. 3 A) 20 min bei 600 x g in KSW zentrifugiert, so trennen sich Cytoplasma und Vakuole voneinander. Die zentrifugierten Zellen werden doppelt mit einem Haar abgebunden. Auf diese Weise erhält man einen kleinen apikalen Teil, der praktisch nur noch vakuolenfreies Cytoplasma enthält (="Stummel", vgl. Abb.42)

und einen größeren basalen Teil mit der Vakuole und einem wandständigen Rest des Cytoplasmas (ca. 2 - 5% des ursprünglichen Cytoplasmavolumens), den "Schlauch". Die abgebundenen Zellteile werden mit einer Wecker-Schere voneinander getrennt (siehe Abb. 3 B) und mit radioaktiven Isotopen, wie beschrieben (3.3), inkubiert.

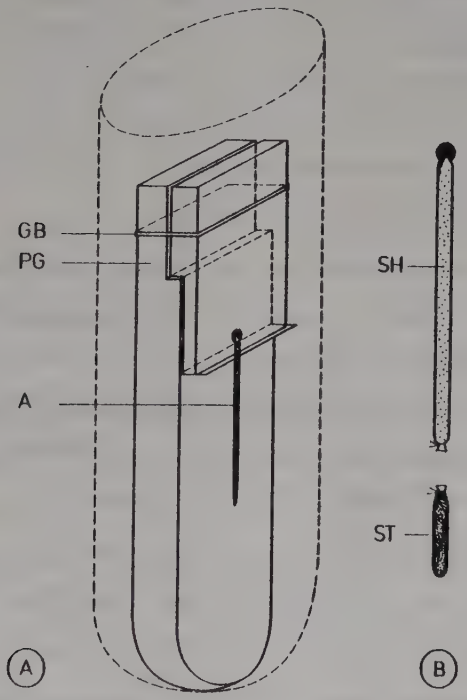


Abb. 3 : A: Zentrifugenbecher (gestrichelt) mit Haltevorrichtung zur Zentrifugation von Acetabularia-Zellen. A = Alge, bedeckt mit KSW; GB = Gummiband; PG = Haltevorrichtung aus Plexiglas.

Abb. 3 : B: Präparierte Acetabularia-Zellabschnitte. SH = "Schlauch" mit großer Vakuole und wenig Cytoplasma; ST = "Stummel", vakuolenfreier Cytoplasmateil.

Die Zellen lassen sich gut mit dem Vitalfarbstoff Neutralrot anfärben. Dadurch ist die leuchtend rot gefärbte Vakuole (pH 1 - 3; [6,18]) deutlich vom gelb gefärbten Cytoplasma (pH ≈ 7) zu unterscheiden. Auf diese Weise kann nach dem Zentrifugieren die Unversehrtheit der Algen geprüft werden (ist die Vakuole noch rot, sind die Membranen intakt). Mit einiger Übung ist es möglich, unversehrte von geschädigten Zellen auch ohne Färbung zu unterscheiden. Nur intakte Zellen sind nach der Zentrifugation voll turgeszent.

Obwohl die Vitalfärbung im Rahmen der Untersuchungen keinen Einfluß auf das elektrophysiologische Verhalten der Algen erkennen ließ (RP ca. -18o mV, elektrische Erregbarkeit gegenüber nicht gefärbten Zellen unverändert), wurden für alle Tracer-Experimente ausschließlich ungefärbte "Stummel" und "Schläuche" verwendet.

Die Durchführung von Efflux-Experimenten mit simultaner Spannungsmessung erfolgte mit zentrifugierten Zellabschnitten wie unter 3.6.1 beschrieben.

Intakte isolierte Zellteile überlebten in KSW mindestens 4 Wochen (Kriterium: RP = -15o bis -18o mV). 2 bis 3 Tage nach der Zentrifugation ließen sich in den "Stummeln" wieder kleine Vakuolen nachweisen, die schätzungsweise 1% des "Stummel"-Volumens ausmachten.

3.9 Präparation von Acetabularia-Zellwänden

Für Effluxmessungen an Acetabularia-Zellwänden wurde die Zelle am apikalen und am basalen Ende abgeschnitten, und der Protoplast mit KSW ausgespült (Spritze mit aufgesetzter Mikropipette). Anschließend wurden die leeren Zellwandröhren an beiden Seiten mit einem Kunststoffaden abgebunden und 3 Tage lang in radioaktiv markiertem KSW inkubiert.

4 Vorversuche

4.1 Rb^+ als Ersatz für K^+

Bevor aus versuchstechnischen Gründen (3.3) $^{86}Rb^+$ anstelle von $^{42}K^+$ eingesetzt wurde, sollte geprüft werden, inwieweit Acetabularia-Zellen Rb^+ statt K^+ tolerieren.

Der Austausch von K^+ durch unmarkiertes Rb^+ im Inkubationsmedium über einen Konzentrationsbereich von $[K^+]:[Rb^+]$ = 9:1 bis 0:10 führte innerhalb von 3 Wochen nicht zu einer meßbaren Auswirkung auf das elektrophysiologische Verhalten der Algen.

Abb. 4 zeigt als repräsentatives Beispiel das Ruhepotential und den Verlauf eines mit "Licht aus" ausgelösten Aktionspotentials bei einer Zelle in KSW und einer zweiten Zelle, die 10 Tage lang in "Rb-KSW" (10 mM Rb^+, kein K^+) inkubiert worden war.

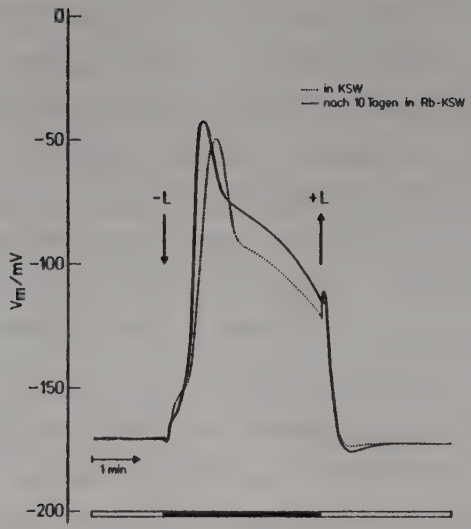


Abb. 4 : Ruhepotential und Verlauf eines Aktionspotentials bei zwei Acetabularia-Zellen nach 10-tägiger Inkubation in KSW (punktierte Kurve), bzw. "Rb-KSW"(10 mM Rb^+, kein K^+; durchgezogene Kurve). Ordinate: Membranspannung V_m/mV. Lichtprogramm: schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an", -L = "Licht aus".

Bei gleichem Ruhepotential sind die Unterschiede zwischen K^+- und Rb^+-inkubierten Zellen im Verlauf des Aktionspotentials nicht signifikant. Sie entsprechen der Streuung der Daten von verschiedenen Zellen, die aus ein und derselben Kultur stammen.

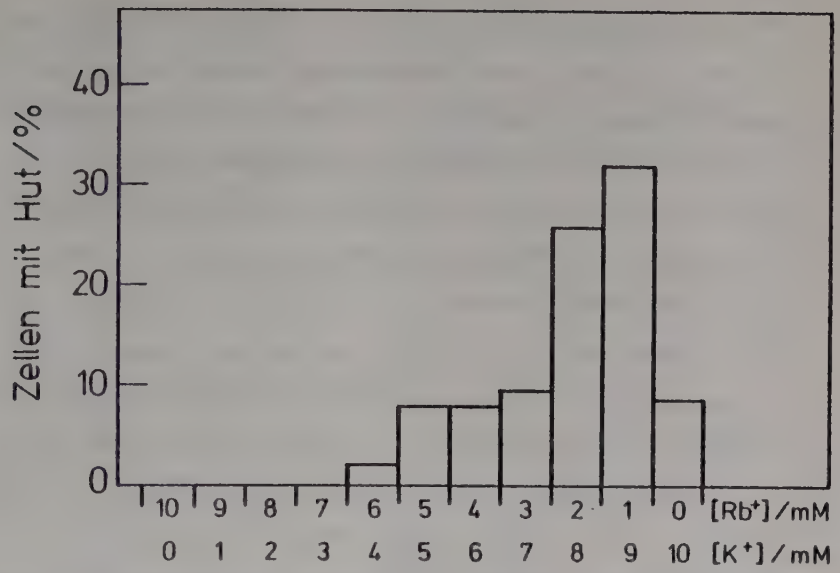


Abb. 5 : Einfluß von verschiedenen Rb^+/K^+-Konzentrationen auf die Hutbildung von Acetabularia-Zellen nach 30-tägiger Inkubation. Ordinate: Zellen mit Hut/ % (30 Zellen = 100%); Abszisse: Konzentrationen von Rb^+ und K^+ im Inkubationsmedium/ mM.

Zeigte sich auch keine Auswirkung des Rb^+ auf das elektrophysiologische Verhalten der Algen, so war doch die Hutbildung der Algen in Medien mit hohen Rb^+- Konzentrationen (> 6 mM Rb^+) im Vergleich zur Kontrolle (10 mM K^+, kein Rb^+) unterdrückt (Abb. 5). Konzentrationen > 6 mM Rb^+ wurden zum Teil auch bei Inkubationsmedien verwendet, doch wurden die Zellen nicht länger als 14 Tage darin inkubiert.

^{86}Rb wandelt sich beim radioaktiven Zerfall in Strontium um. Die maximale Strontium-Konzentration in der Zelle, nach 14-tägiger Inkubation mit $^{86}Rb^{+}$, war immer kleiner als 10^{-7}M. Physiologische Auswirkungen derartiger Strontium-Konzentrationen auf Acetabularia-Zellen sind nicht bekannt und konnten im Verlaufe der Arbeit auch nicht festgestellt werden.

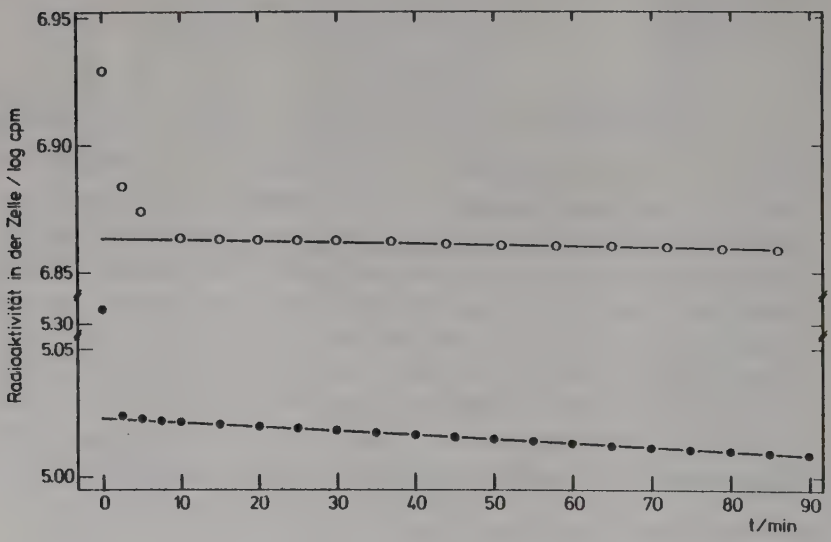


Abb. 6 : Beispiel für den Verlauf von K^{+}-Efflux-Kinetiken unter Verwendung von $^{86}Rb^{+}$ (Kreise) und $^{42}K^{+}$ (Punkte) als Tracer für K^{+}. Ordinate: Radioaktivität in der Zelle/log cpm; Abszisse: Zeit nach Beginn des Auswaschens t/min.

4.2 $^{86}Rb^+$ als Tracer für K^+ bei Acetabularia

Wie unter 3.3 bereits erwähnt, wurde für die K^+-Efflux-Experimente mit simultaner Spannungsmessung (5.2.1) $^{86}Rb^+$ als Tracer für K^+ gewählt.

Viele Organismen nehmen K^+ gegenüber Rb^+ bevorzugt auf, wie z.B. Nitellopsis obtusa [28], Elodea densa [25], Ulva lactuca, Chaetomorpha darwinii [41] oder auch Escherichia coli [33]. Auch bei Acetabularia zeigt ein Vergleich der Effluxergebnisse unter Verwendung von $^{86}Rb^+$ mit den $^{42}K^+$-Effluxergebnissen, daß zwischen diesen beiden Ionen deutlich unterschieden wird.

Abb. 6 (obere Kurve) zeigt eine $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux-Kinetik mit der sehr großen Zeitkonstanten τ = 343 h. Die untere Kurve ist eine $K^+(^{42}K^+)$-Efflux-Kinetik, deren Zeitkonstante mit τ = 47,5 h etwa 7 mal kleiner ist. Demnach wird $^{42}K^+$ in diesem Beispiel um den Faktor 7 schneller ausgetauscht als $^{86}Rb^+$.

Unter der Annahme $\Phi_{Rb^+} = \Phi_{K^+}$ [30] errechneten sich die K^+-Flüsse aus ca. 100 Flußexperimenten mit $^{86}Rb^+$ zu $0{,}9 - 2{,}6 \times 10^{-8}$ Mol $m^{-2}s^{-1}$, während sich nun für den $K^+(^{42}K^+)$-Fluß (n = 46) Werte von $5{,}2 - 17{,}5 \times 10^{-8}$ Mol $m^{-2}s^{-1}$ ergeben. Damit nimmt Acetabularia K^+ gegenüber Rb^+ um den Faktor 5 - 10 schneller auf. Aus diesem Grunde sind die K^+-Flußberechnungen von Experimenten mit $^{86}Rb^+$ mit dem Faktor 7,5 für die geringere Permeabilität der Membran für Rb^+ korrigiert.

5 Ergebnisse

5.1 Stationäre Zustände

5.1.1 Influx

5.1.1.1 Influx von $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 21°C

Die Aufnahme von $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ in Acetabularia-Zellen bei Normaltemperatur (21±1°C) ist in Abb.7 dargestellt als Anstieg der radioaktiven Spezifität S_Z^*/S_o^* in der Zelle in Abhängigkeit von der Inkubationszeit t_{in}. Die Zellen sind "durchmarkiert", wenn $S_Z^* = S_o^*$ und damit $S_Z^*/S_o^* = 1$ ist.

Die Abbildung zeigt, daß die radioaktive Spezifität von $^{42}K^+$ in der Zelle, verglichen mit der von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$, nur langsam ansteigt. Die $^{42}K^+$-Spezifität wächst im untersuchten Zeitraum (bis t_{in}= 4 h) annähernd linear und erreicht dabei nach t_{in}= 3 h einen Wert von $S_Z^*/S_o^* = 0{,}03$. Das entspricht einer radioaktiven Markierung der K^+-Ionen in der Zelle von 3%. Demgegenüber erfolgt der Spezifitätsanstieg für $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ wesentlich schneller und nicht linear. Nach t_{in}= 3 h sind die Zellen bereits zu etwa 50% mit $^{22}Na^+$ bzw. $^{36}Cl^-$ markiert.

Auffallend ist die weitgehende Übereinstimmung im zeitlichen Verlauf des Spezifitätsanstieges von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$. Nach einem schnellen, annähernd linearen Anstieg bis t_{in}= 0,5 h auf $S_Z^*/S_o^* = 0{,}2$, erreicht die radioaktive

Spezifität für beide Ionen erst nach t_{in} = 2 h den doppelten Wert. Da $[Na^+]_i$ = 70 mM und $[Cl^-]_i$ = 500 mM ist [34], läßt sich aus dem Verlauf der Aufnahmekurven für $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ in Abb. 7 abschätzen, daß die Zellen pro Zeiteinheit etwa um den Faktor 7 mehr Cl^- als Na^+ aufnehmen.

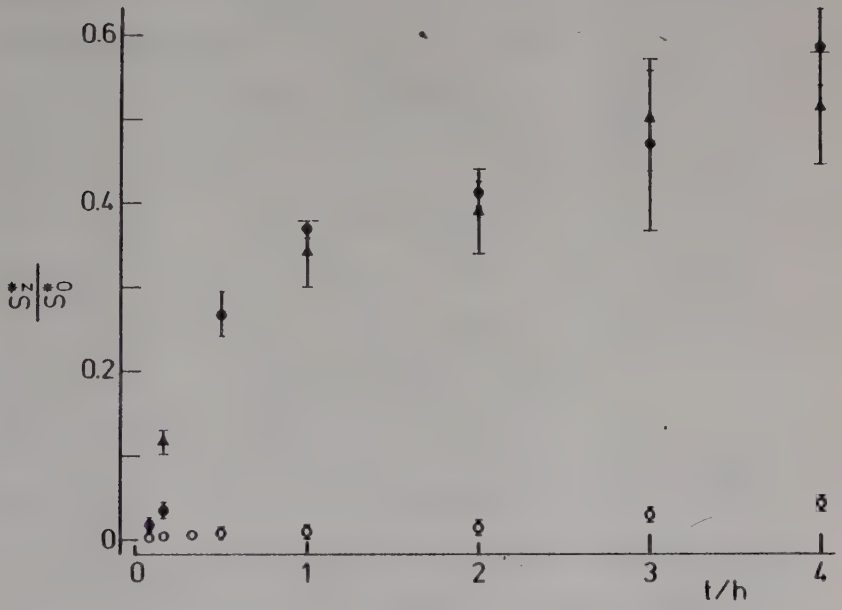


Abb. 7 : Aufnahme von $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 21°C (Licht ca. 10 W m^{-2})

Anstieg der radioaktiven Spezifität in der Zelle (S^*_Z/S^*_0) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Inkubation (t/h). o = $^{42}K^+$; ▲ = $^{22}Na^+$; ● = $^{36}Cl^-$; Mittelwerte ±S.E.

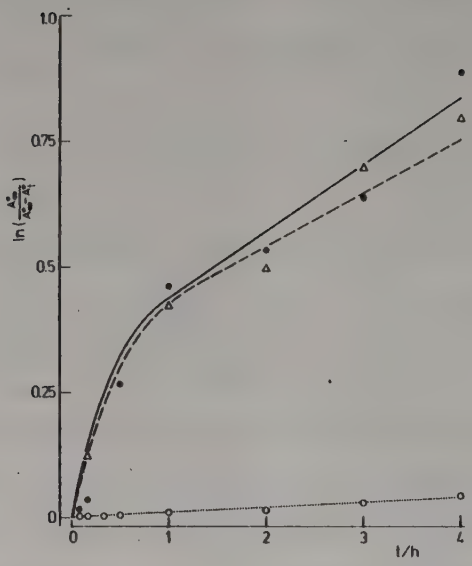


Abb. 8 : Aufnahme von $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 21°C (Licht ca. 10 W m^{-2})

Relative Radioaktivität in der Zelle: $\ln(A^*_\infty/A^*_\infty - A^*_t)$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Inkubation (t/h)
o = $^{42}K^+$; Δ = $^{22}Na^+$; ● = $^{36}Cl^-$

Da $[K^+]_i$ = 45o mM [34] und damit $[K^+]_i \approx [Cl^-]_i$ ist, läßt sich aus dem langsamen Anstieg der $^{42}K^+$-Spezifität schließen, daß offenbar nur sehr wenig K^+ pro Zeiteinheit in die Zelle aufgenommen wird. Dieses Ergebnis ist besonders bemerkenswert, weil auf das gut permeable K^+-Ion

($P_K >> P_{Na,Cl}$; [35]) bei einem Ruhepotential (RP) von -170 mV, erzeugt durch eine elektrogene Cl^--Pumpe, und einem K^+-Diffusionspotential E_K = -96 mV ≈ E_D eine elektromotorische Kraft von ca. 75 mV für den K^+-Influx wirkt. Bei RP wäre demnach ein Netto-K^+-Influx zu erwarten, bis K^+ bei einer Innenkonzentration von ca. 8 - 9 M wieder im elektrochemischen Gleichgewicht wäre. Nach Abb. 7 ist die gemessene K^+-Aufnahme aber sehr klein. Außerdem halten die Zellen $[K^+]_i$ etwa konstant bei 450 mM [34]. Damit stellt sich die Frage nach den Mechanismen, die eine Akkumulation von K^+-Ionen in der Zelle verhindern. Zunächst ist dabei an einen aktiven K^+-Export zu denken [35]. Ein alternativer Mechanismus zur Regulation des K^+-Haushaltes von Acetabularia mit Hilfe von Aktionspotentialen ist in [30] dargestellt.

Für die Influx-Kinetiken der Ionen $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$, wie sie in Abb. 8 dargestellt sind, wurde $\ln(A^*_\infty/A^*_\infty - A^*_t)$ gegen t_{in} aufgetragen. A^*_∞, die Radioaktivität in der Zelle nach $t_{in} = \infty$ ($\hat{=}$ $S^*_Z/S^*_o = 1$) läßt sich berechnen als Produkt aus S^*_o und dem entsprechenden Ionengehalt der Zelle. A^*_t ist die Radioaktivitätsmenge in der Zelle nach $t_{in} = t$. In dieser halblogarithmischen Darstellung erscheint die $^{42}K^+$-Aufnahme als Gerade und folgt damit der einfachen Exponentialfunktion

$$A^*_t = A^*_\infty (1 - \exp -kt), \qquad (1)$$

wobei die Reaktionskonstante k die Steigung der Geraden angibt. Die Zeitkonstante τ der Aufladung erhält man aus $\tau = k^{-1}$. Sie beträgt im Falle von $^{42}K^+$ 98,2 ± 9 h

(siehe Tab. 1). Die Zellen sind nach $t1/2 = \tau \times \ln 2 = 68$ h zu 50% mit $^{42}K^+$ markiert. Die Ionen $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ erreichen diesen Wert, wie oben gezeigt, bereits 3 Stunden nach Beginn der Inkubation. Die $^{42}K^+$-Aufnahme in Acetabularia-Zellen entspricht einem Influx von $10{,}2 \pm 2 \times 10^{-8}$ Mol $K^+ m^{-2} s^{-1}$.

Eine zweite Flußphase für die K^+-Aufnahme, mit einer noch größeren Zeitkonstanten, wurde auch mit $^{86}Rb^+$-Influx-messungen (bis $t_{in} = 100$ h) nicht gefunden.

Tab. 1 : Aufnahme von $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ in Acetabularia-Zellen bei 21 ± 1 °C (Licht ca. 10 W m^{-2}); Mittelwert ± S.E.

Ion	Anzahl der Exp. n	Anzahl d. Phasen d. Influx-kinetik	Zeitkonstante der Radioaktivitäts-aufnahme τ/min Komp.2	τ/h Komp.3	Rel.Verhältnis d. Radioaktivitäts-mengen in den Flußkomponenten	Influx 10^{-8} Mol m^{-2} s^{-1} Komponente 2	Komponente 3
K^+	42	1	98,2 ± 9 h			10,2 ± 2,1	
Na^+	24	2	18,5±2	3,5±0,6	≈ 1:1	230 ± 26	20,2 ± 2,4
Cl^-	43	2	18,8±2,7	3,4±0,7	≈ 1:1	1740 ± 410	146 ± 25

Die Aufnahmekinetiken von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ sind in der halblogarithmischen Darstellung 2-phasig und geben damit die Aufnahme der Ionen in zwei unterschiedlich schnell austauschende flußkinetische Komponenten wieder. Derartige Influx-Kinetiken lassen sich ebenso wie Efflux-Kinetiken mit dem unter 3.6.2 beschriebenen Subtraktionsverfahren analysieren. Dazu werden die Influx-Daten als $\ln(A^*_\infty - A^*_t)$ gegen t_{in} aufgetragen. Die Ergebnisse dieser Analyse sind in Tab. 1 zusammengefaßt.

Die Aufnahme von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ während der schnellen Anfangskomponente erfolgt mit einer Zeitkonstanten von ca. 19 min. Das entspricht einem Na^+-Influx von $230 \pm 26 \times 10^{-8}$ Mol $m^{-2}s^{-1}$ und einem Cl^--Influx von $1740 \pm 410 \times 10^{-8}$ Mol $m^{-2}s^{-1}$. Daran anschließend erfolgt für $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ eine langsamere Aufnahme mit etwa gleicher Zeitkonstanten von 3,5 h. Für diese Influx-Komponente resultiert ein Na^+-Influx von $20,2 \pm 2,4 \times 10^{-8}$ Mol $m^{-2}s^{-1}$ und ein Cl^--Influx von $146 \pm 25 \times 10^{-8}$ Mol m^{-2}

Das Verhältnis von $Influx_{Na^+}/Influx_{Cl^-}$, das bereits aus Abb. 7 auf 1:7 geschätzt wurde, errechnet sich für die schnelle Anfangskomponente der Influx-Kinetik zu 1:7,6 und für die anschließende langsame Komponente zu 1:7,2 (vgl. Tab. 1) und bestätigt damit den weitgehend übereinstimmenden Spezifitätsanstieg der Ionen $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ (Abb. 7) bei $[Na^+]_i : [Cl^-]_i = 1:7$.

5.1.1.2 Influx von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 4^oC

Die Aufnahme der Ionen $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ in Acetabularia-Zellen bei 4^oC, in Abb. 9 wieder dargestellt als Anstieg der radioaktiven Spezifität (S^*_Z/S^*_0) in der Zelle, unterscheidet sich stark von der Aufnahme bei NT (vgl. Abb. 7). Die $^{36}Cl^-$-Aufnahme ist deutlich reduziert. So sind die Zellen bei 4^oC erst nach $t_{in} \approx 24$ h zur Hälfte markiert ($S^*_Z/S^*_0 = 0,5$), während dieser Wert bei NT schon nach $t_{in} \approx 3$ h erreicht wird. Außerdem zeigt Abb. 10, daß die Influx-Kinetik in der halblogarithmischen Darstellung, im Gegensatz zu der Influxkinetik bei NT (vgl. Abb. 8), mindestens bis zu $t_{in} = 50$ h linear ansteigt und damit 1-phasig ist. Demnach ist die schnelle Anfangskomponente der Influx-Kinetik bei NT unter diesen Versuchsbedingungen unterdrückt. Zudem erfolgt die Aufladung mit $^{36}Cl^-$ bei 4^oC noch langsamer als während der langsamen Komponente der NT-Aufnahmekinetik: $\tau(4^oC) = 13,8$ h, gegenüber $\tau(NT,langs.) = 3,4$ h (vgl. Tab. 1 und 2). Der Cl^--Influx bei 4^oC beträgt $73 \pm 7 \times 10^{-8}$ Mol $m^{-2}s^{-1}$ und ist damit nur halb so groß wie der Cl^--Influx der langsamen Komponente bei NT. Da die Cl^-- Menge in der langsamen Komponente der NT-Aufnahme nur 50% der Gesamtmenge beträgt, verglichen mit den 100%, die in der 1-phasigen Kinetik bei 4^oC erscheinen, beträgt der Cl^-- Fluß bei 4^oC nur die Hälfte des Wertes bei NT, während sich die Zeitkonstanten $\tau(4^oC)$ und $\tau(NT,langs.)$ wie 4:1 verhalten.

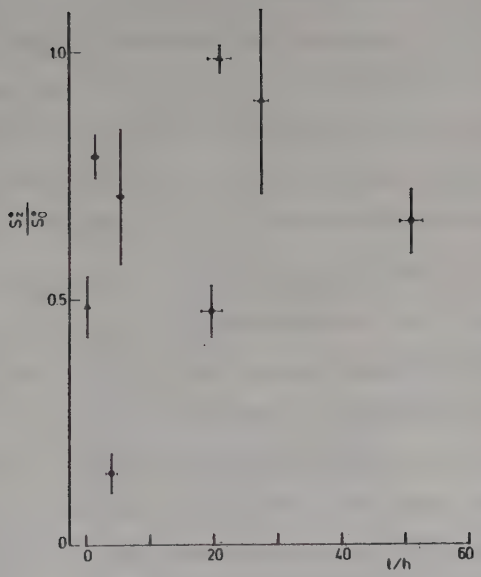


Abb. 9 : Aufnahme von $^{22}Na^{+}$ und $^{36}Cl^{-}$ bei $4^{o}C$
(Licht ca. 10 W m^{-2})

Anstieg der radioaktiven Spezifität in der Zelle (S^{*}_{Z}/S^{*}_{o}) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Inkubation (t/h)
▲ = $^{22}Na^{+}$; ● = $^{36}Cl^{-}$; Mittelwerte ± S.E.

In der Kälte ($4^{o}C$) ist somit der gesamte Cl^{-}-Influx drastisch reduziert und die Influx-Kinetik zeigt nur noch die Aufnahme von $^{36}Cl^{-}$ in eine einzige flußkinetische Komponente.

Die Ergebnisse der $^{22}Na^{+}$-Aufnahme bei $4^{o}C$ ergaben zunächst

ein sehr uneinheitliches Bild. Die Ergebnisse der $^{22}Na^+$-Aufnahmemessungen streuten sehr stark von Zelle zu Zelle (Abb. 9), und S_Z^*/S_o^* erreichte bei längeren Inkubationszeiten (t_{in} > 20 h) zum Teil Werte, die scheinbar deutlich über dem theoretischen Maximalwert von $S_Z^*/S_o^* = 1$ lagen (für $[Na^+]_i$ = const.;vgl. 5.1.1.1), den Wert $S_Z^*/S_o^* = 3$ aber nicht wesentlich überschritten (max. $S_Z^*/S_o^* = 3,4$).

Abb. 9 zeigt die $^{22}Na^+$-Aufnahme bei 4°C für Zellen, deren radioaktive Spezifität im untersuchten Zeitraum innerhalb der theoretischen Grenzbedingung lag. Wie Abb. 10 zeigt, verläuft die Influx-Kinetik in der Kälte ebenso wie bei NT 2-phasig. Die schnelle Anfangskomponente kann in dieser Darstellung nicht genau bestimmt werden (siehe dazu Abb. 11). Die anschließende langsamere Komponente hat eine Zeitkonstante von τ = 5,2 h (Tab. 2) und ist damit langsamer als die langsame Komponente der Influx-Kinetik bei NT (τ NT,langs.= 3,5 h).

Eine zweite Klasse von Zellen erreichte Werte von $S_Z^*/S_o^* > 1$ bis $S_Z^*/S_o^* \approx 3$. Geht man davon aus, daß die Zellen nicht zwischen markiertem und unmarkiertem Na^+ unterscheiden können, bleibt als Erklärung nur noch, daß $[Na^+]_i$ bei 4°C etwa um den Faktor 3 größer ist als bei NT, d.h. $[Na^+]_{i,4^o} \approx 200$ mM. Demnach kommt es bei der Inkubation der Zellen bei 4°C zu einer Netto-Aufnahme von Na^+ bis zu einer Innenkonzentration von durchschnittlich 200 mM.

Dieses Ergebnis läßt sich so interpretieren: Das Ruhepotential der Zelle bei NT liegt bei ca. -170 mV. Für

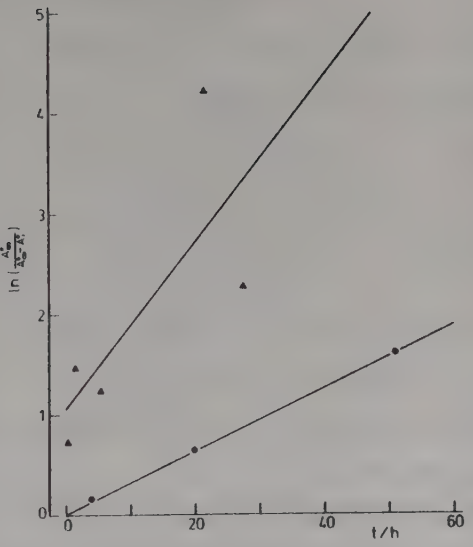


Abb. 10 : Aufnahme von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 4°C
(Licht ca. 10 W m^{-2})

Relative Radioaktivität in der Zelle: $\ln(A^*_\infty/A^*_\infty - A^*_t)$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Inkubation (t/h).
▲ = $^{22}Na^+$; ● = $^{36}Cl^-$

$[Na^+]_o$ = 461 mM und $[Na^+]_i$ = 71 mM [34] errechnet sich nach Nernst ein Gleichgewichtspotential von

$$E_{Na} = -58 \text{ mV} \log [Na^+]_i/[Na^+]_o = +47 \text{ mV} \qquad (2)$$

Demnach besteht bei RP eine treibende Kraft von 217 mV für die Na^+-Aufnahme. Um eine Akkumulation von Na^+-Ionen in der Zelle zu vermeiden, muß Na^+ gegen diesen elektrochemischen

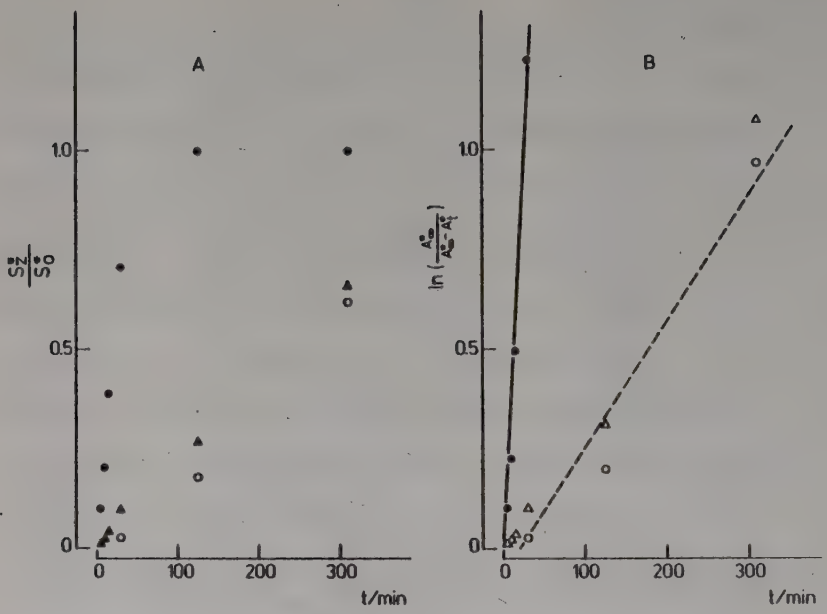


Abb. 11 : $^{22}Na^+$-Aufnahme bei 4°C (Licht ca. 10 W m^{-2})

A: Anstieg der radioaktiven Spezifität (S^*_Z/S^*_o) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Inkubation (t/min).

B: Relative Radioaktivität: $\ln(A^*_\infty/A^*_\infty - A^*_t)$ in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn der Inkubation (t/min).

● = Cytoplasma; ○ = Vakuole; ▲ = Zelle

Gradienten aus der Zelle transportiert werden.

Bei 4°C arbeitet die elektrogene Pumpe nicht mehr, und RP sinkt ab auf das Diffusionspotential $E_D \approx -70$ bis -80 mV $\approx E_K$. Auch bei E_D besteht noch eine treibende Kraft (ca. -130 mV) für den Na^+-Import. Ist der ausgleichende Na^+-Export bei 4°C gehemmt, kommt es zu einer Netto-Aufnahme von Na^+. $[Na^+]_i$ steigt dabei bis ca. 200 mM.

Höhere Innenkonzentrationen von Na^+ wurden möglicherweise deshalb nicht gefunden, weil sie zu offenbaren Schädigungen der Zellen führen und geschädigte Zellen nicht zu Messungen herangezogen wurden.

Der zeitliche Verlauf der $^{22}Na^+$-Aufnahme (bis t_{in} = 6 h) für Zellen, die eine erhöhte Na^+-Innenkonzentration aufwiesen, ist in Abb. 11 dargestellt. Dieser Abbildung liegt als Grenzwert $[Na^+]_i$ = 200 mM zugrunde. Teil A der Abbildung zeigt wiederum den Anstieg von S^*_Z/S^*_o und zwar sowohl bezogen auf die ganze Zelle als auch aufgegliedert in den Anstieg der Spezifität in der schnellen Komponente (Cytoplasma) und in der langsamen Komponente (Vakuole).

Der Anstieg der radioaktiven Spezifität in der Zelle erfolgt, wie auch in Abb. 9 , zunächst sehr schnell (bis $t_{in} \approx 30$ min), wird dann etwas langsamer und erreicht nach t_{in} = 200 - 250 min den Wert 0,5. Die Darstellung des Spezifitätsanstieges in Cytoplasma und Vakuole beruht auf den Annahmen $[Na^+]_{Cyt.} = [Na^+]_{Vak.}$ und $Vol._{Cyt.} = 1/10\ Vol._{Va}$ [34]. Die Daten für die Aufladung von Cytoplasma und Vakuole stammen aus Effluxexperimenten nach den entsprechenden Aufladezeiten.

Das Cytoplasma erreicht sehr schnell hohe Spezifitäten und ist spätestens nach t_{in} = 125 min voll "durchmarkiert". Die Aufladung der Vakuole beginnt erst nach einer kleinen lag-Phase und erfolgt wesentlich langsamer. Die Influx-Kinetiken für die beiden Kompartimente Cytoplasma und Vakuole (Abb. 11 B) zeigen in der halblogarithmischen

Darstellung lineare Aufnahme für Cytoplasma und Vakuole. Die Aufladung des Cytoplasmas erfolgt mit einer Zeitkonstanten von τ = 10,8 min, gegenüber τ = 5,2 h für die Vakuole. Unter Anwendung konventioneller Kompartimentsanalyse entspricht das einem Influx von 229 x 10^{-8} Mol $Na^+ m^{-2} s^{-1}$ bzw. 69,5 x 10^{-8} Mol $Na^+ m^{-2} s^{-1}$ (vgl. Tab. 2).

Wird bei der beschriebenen Na^+-Netto-Aufnahme alles aufgenommene Na^+ elektrisch durch eine Aufnahme von Cl^- kompensiert, hat sich bei $[Na^+]_i$ = 200 mM die Na^+-Konzentration um etwa 300% ihres Wertes bei NT erhöht, während die Cl^--Konzentration nur um 25% auf ca. 630 mM gestiegen ist. Das Verhältnis $[Na^+]_i$: $[Cl^-]_i$ ist dann 1:3 (bei NT 1:7). Wie unter 5.1.1.1 gezeigt, verhalten sich die Flüsse von Na^+ und Cl^- bei gleichen Zeitkonstanten für die Aufnahme wie die Konzentrationen dieser Ionen in der Zelle. Ist umgekehrt das Verhältnis der Zeitkonstanten τ_{Na}/τ_{Cl} gleich dem Verhältnis der Innenkonzentrationen dieser Ionen, müssen sich die Flüsse wie 1:1 verhalten.
Vergleicht man die langsame Komponente der Na^+-Aufnahme (Abb. 11 B), wobei $\tau_{langs.} \approx \tau_{gesamt}$, mit der Cl^--Aufnahme, so ergibt sich ein Verhältnis τ_{Na}/τ_{Cl} = 1:2,7. Bei $[Na^+]_{Cyt.} = [Na^+]_{Vak.}$ und $[Na^+]_i/[Cl^-]_i$ = 1:3 ergibt sich für den Influx der langsamen Komponente bei 4°C $\Phi_{in}(Na^+) = \Phi_{in}(Cl^-)$ = 70 x 10^{-8} Mol $m^{-2} s^{-1}$ (vgl. Tab. 2).

Tab. 2 : Aufnahme von $^{22}Na^{+}$ und $^{36}Cl^{-}$ bei 4°C (Licht ca. 10 W m
(Mittelwerte ± S.E.)

Ion	Anzahl der Exp. n	Anzahl d. Phasen d. Influx-kinetik	Zeitkonstante der Radioaktivitäts-aufnahme τ/min Komp.2	τ/h Komp.3	Rel.Verhältnis d. Radioaktivitäts-mengen in den Flußkomponenten	Influx 10^{-8} Mol m^{-2} s^{-1} Komponente 2	Komponente 3
Na^{+}	39	2	10,8±2,1	5,2±1,1	1:1 bis 1:10	229 ± 31	69,5 ± 9
Cl^{-}	17	1	13,8 ± 1,5 h			73 ± 7	

5.1.2 Efflux

5.1.2.1 Formale Behandlung

Die Terminologie der konventionellen Kompartimentsanalyse [8] beruht auf gewissen Annahmen, von denen sich, wie wir sehen werden, einige für Acetabularia nicht halten lassen. Der Gebrauch dieser Terminologie würde daher zu Fehldeutungen führen (vgl. 5.1.2.3.3). Deswegen analysieren wir die Efflux-Kinetiken zunächst rein formal in "Komponenten", und führen die Diskussion über die entsprechenden "Kompartimente" erst später (6.1.2).

An einem Beispiel (Abb. 12) sollen die in dieser Arbeit verwendeten allgemeinen Begriffe erläutert werden. Abb. 12 zeigt eine Efflux-Kinetik von $^{22}Na^{+}$ bei NT. Diese Gesamtkinetik läßt sich durch das unter 3.6.2 beschriebene Subtraktionsverfahren in 3 "Komponenten"zerlegen (Abb. 12 A-C), die in halblogarithmischer Darstellung jeweils als Geraden erscheinen. Jede Komponente läßt sich beschreiben durch ihre Zeitkonstante τ und ihren Radioaktivitätsgehalt A^{*}_{0} zur Zeit t = 0, d.h. zu Beginn des Auswaschens mit nichtradioaktivem Medium.

Den Anfang aller untersuchten Efflux-Kinetiken bildet eine sehr schnelle "Komponente 1", mit τ_1 und A^{*}_{01}, wobei τ_1 immer im Bereich von ca. 1 - 2 min liegt. Wie unter 5.1.2.2.1 und 5.1.2.2.2 dargelegt, muß Komponente 1 der Abgabe von Radioaktivität aus dem Zellwand-free-space zugeordnet werden.

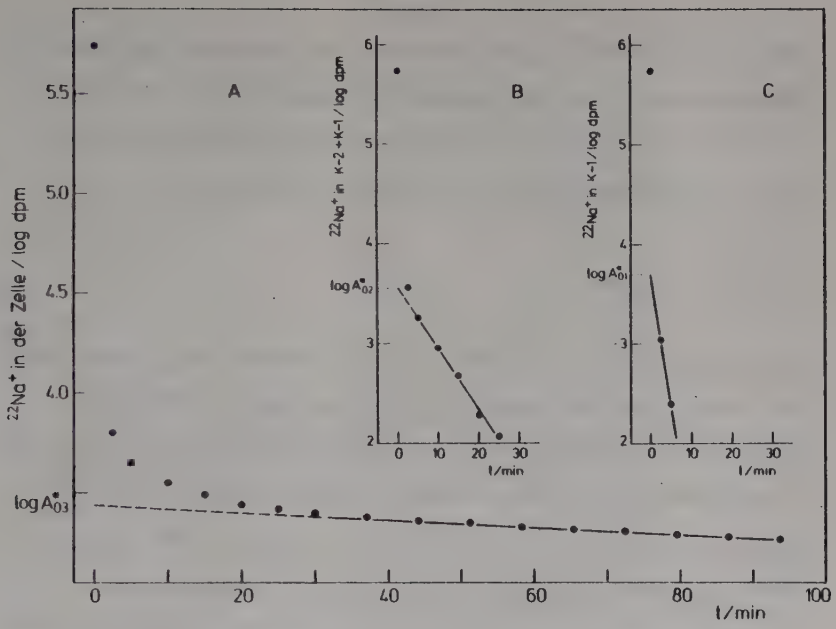


Abb. 12 : $^{22}Na^+$- Abgabe bei 21°C (Licht ca. 80 W m^{-2})

A: $^{22}Na^+$ in der Zelle/log dpm, in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min). Unterbrochene Linie: Extrapolation des linearen Anteils der Abgabe-Kinetik auf t = 0, ergibt log A^*_{03}.

B: $^{22}Na^+$ in den Flußkomponenten K-2 + K-1 /log dpm, in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min). Unterbrochene Linie: Extrapolation des linearen Anteils der Abgabe-Kinetik auf t = 0, ergibt log A^*_{02}.

C: $^{22}Na^+$ in der Flußkomponente K-1 /log dpm, in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min). Extrapolation des linearen Teils der Abgabe-Kinetik auf t = 0 ergibt log A^*_{01}.

Die anderen Komponenten werden in der Reihenfolge ihres Erscheinens in der Gesamtkinetik entsprechend mit den m Indizes 2,3,...,n gekennzeichnet. Die Gesamtkinetik ist somit zusammengesetzt aus n Exponentialfunktionen:

$$A^*_t = \sum_{m=1}^{n} A^*_{0m} \exp -k_m t \quad . \qquad (3)$$

Da Komponente 1 immer auftritt, und keinen Aufschluß über die Anzahl und die Anordnung der intrazellulären Flußkompartimente gibt, wird sie bei der Bestimmung der Anzahl der Phasen einer Kinetik nicht berücksichtigt. Dementsprechend handelt es sich bei dem Beispiel Abb. 12 um eine 2-phasige Efflux-Kinetik, die in 3 Komponenten zerlegt ist.

Nach $t_{in} = \infty$ ist die Zelle "durchmarkiert". Bei gleichen Konzentrationen des untersuchten Ions in den Komponenten 2 und 3 gibt dann das Verhältnis A^*_{02}/A^*_{03} das Volumenverhältnis dieser Komponenten wieder [39].

5.1.2.2 Efflux von $^{42}K^+$ bei Normaltemperatur (21°C)

5.1.2.2.1 Zuordnung der Efflux-Komponenten

Die $^{42}K^+$-Efflux-Kinetik bei Normaltemperatur (Abb. 13) zeigt, im Gegensatz zu der 1-phasigen Influx-Kinetik (Abb. 8), zunächst die Abgabe von $^{42}K^+$ aus 2 flußkinetischen Komponenten. Einer sehr schnellen Anfangskomponente (τ im Bereich von etwa 1 min) folgt eine sehr langsame

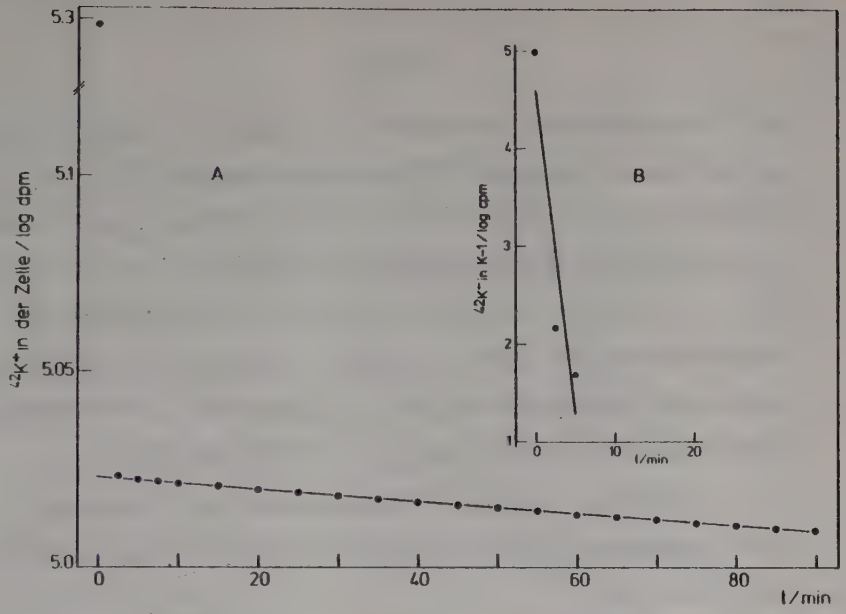


Abb. 13 : $^{42}K^+$-Abgabe bei 21°C (Licht ca. 80 W m^{-2})
A: $^{42}K^+$ in der Zelle/(log cpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).
B: $^{42}K^+$ in der Flußkomponente K-1 /(log cpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens.

Komponente mit einer Zeitkonstanten von τ = 60,5 ± 6 h, die im Bereich der Zeitkonstanten für den Influx liegt (vgl. Tab. 1 und 3) und einem K^+-Efflux von 14,1 ± 1,4 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ entspricht.

In Abb. 13 B ist die $^{42}K^+$-Abgabe aus der schnellen Anfangskomponente der Gesamtkinetik aufgetragen (vgl.3.6.2). Mit einer Zeitkonstanten von τ = 0,66 min ist sie mindestens 15 mal schneller als jede der Influxkomponenten der untersuchten Ionen (vgl. Tab. 1 und 2). Aus folgenden Gründen soll diese Komponente der Zellwand zugeordnet werden.

Die $^{42}K^+$-Efflux-Kinetik in Abb. 13 stammt von einer Zelle, die 21 Stunden lang mit $^{42}K^+$ inkubiert worden war, ein Volumen von 1,98 x $10^{-9}m^3$ und eine Oberfläche von 26,5 mm^2 hatte. Die schnelle Anfangskomponente muß "durchmarkiert" sein und damit die gleiche radioaktive Spezifität wie das Inkubationsmedium haben, $S_i^* = S_o^*$. 1 cpm in der schnellen Komponente repräsentiert damit zu Beginn des Auswaschens ebensoviel Mol K^+, wie 1 cpm im Inkubationsmedium.

Die radioaktive Spezifität des Außenmediums ist bekannt. Damit läßt sich das Volumen V_1 der schnellen Komponente abschätzen als:

$$V_1 = A_{01}^* \times S_o^*/c \quad . \qquad (4)$$

Bekannt sind: A_{01}^* = 39000 cpm, S_o^* = 0,14 x 10^{-12} Mol K^+cpm^{-1} und die Konzentrationen $c = [K^+]_i$ = 450 mM und $c = [K^+]_o$ = 10 mM. Handelt es sich bei der schnellen Anfangskomponente um eine intrazelluläre Flußkomponente, errechnet sich das Volumen der schnellen Komponente mit $c = [K^+]_i$ zu 1,2 x $10^{-11}m^3$. Das entspricht einem Anteil von 0,6% am Zellvolumen und kann deshalb unter den Annahmen der konventionellen Kompartimentsanalyse [8] nicht einem intrazellulären Kompartiment, wie etwa Cytoplasma, Vakuole oder Plastiden zugeordnet werden. Für $c = [K^+]_o$ errechnet sich das Volumen der schnellen Komponente zu 0,55 x $10^{-9}m^3$, es kann sich aber nun nicht mehr um ein intrazelluläres Kompartiment handeln.

Damit bleibt noch die Möglichkeit, die schnelle Anfangskomponente der $^{42}K^+$-Abgabe aus der Zellwand zuzuordnen. Das Volumen der Zellwand beträgt in diesem Beispiel, bei einer mittleren Wanddicke von 20 µm [34] V_{Wand} = 0,53 x $10^{-9}m^3$.

Dieses Volumen stimmt gut mit den oben errechneten $0{,}55 \times 10^{-9} m^3$ überein. Damit gibt die schnelle Anfangskomponente der Efflux-Kinetik Abb. 13, die "Komponente 1" (vgl. 5.1.2.1), offensichtlich die Abgabe von $^{42}K^+$ aus der Zellwand wieder.

Diese schnelle Komponente taucht in den Influx-Kinetiken nicht auf, da die Zellwand vor den Influxmessungen ausgewaschen wurde (3.6.3). Dementsprechend werden sowohl die Kinetik für die $^{42}K^+$-Aufnahme (Abb. 8) als auch die Kinetik für die $^{42}K^+$-Abgabe (Abb. 13) als "1-phasig" bezeichnet (vgl. 5.1.2.1).

5.1.2.2.2 Abgabe von $^{86}Rb^+$ aus Acetabularia-Zellwänden

Messungen des $^{86}Rb^+$-Efflux aus Zellwänden bestätigen die oben dargelegte Interpretation. Abb. 14 zeigt die $^{86}Rb^+$-Abgabe aus einer Acetabularia-Zellwand. Die Zeitkonstante beträgt in diesem Beispiel 0,4 min. Aus den Abmessungen der Wand (Wanddicke wie oben angenommen) errechnet sich ein Volumen von $0{,}46 \times 10^{-9} m^3$. Die Abschätzung über den $^{86}Rb^+$-Radioaktivitätsgehalt zur Zeit t = 0 ergibt ein Wandvolumen von $0{,}52 \times 10^{-9} m^3$.

Der nicht-lineare Anfangsteil der in Abb. 14 dargestellten Efflux-Kinetik läßt sich nach Subtraktion der Wandkomponente in halblogarithmischer Darstellung ebenfalls linearisieren. Er ist auf die Auswaschung außen an der Zelle haftender Radioaktivität zurückzuführen und zeigt mit einer Zeitkonstanten von ca. 5 s die Zeitkonstante der Efflux-Apparatur (Abb. 14 B).

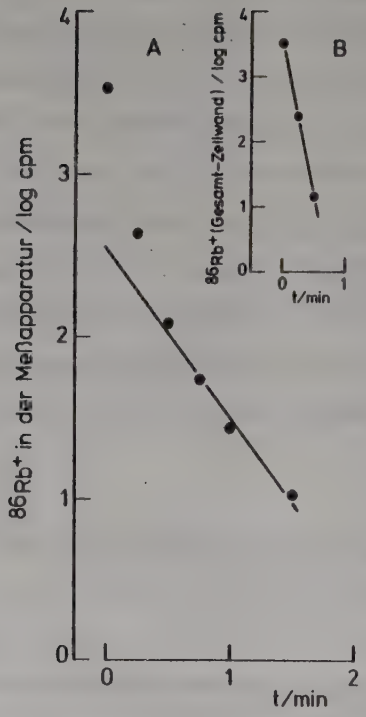


Abb. 14 : Abgabe von $^{86}Rb^+$ aus einer Acetabularia-Zellwand

A: $^{86}Rb^+$ in der Meßapparatur /(log cpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

B: $^{86}Rb^+$-Gehalt (Gesamt - Zellwand)/(log cpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

5.1.2.2.3 $^{42}K^+$-Efflux-Kinetiken mit Versetzungen

Neben Efflux-Kinetiken wie in Abb. 13, finden sich für die $^{42}K^+$-Abgabe auch Kinetiken, wie sie in Abb. 15 anhand von 2 Beispielen dargestellt sind. Auffallend sind dabei die Versetzungen im Verlauf der Kinetiken (Abb. 15, obere Kurve nach t = 10 min; untere Kurve nach t = 15 und 40 min).

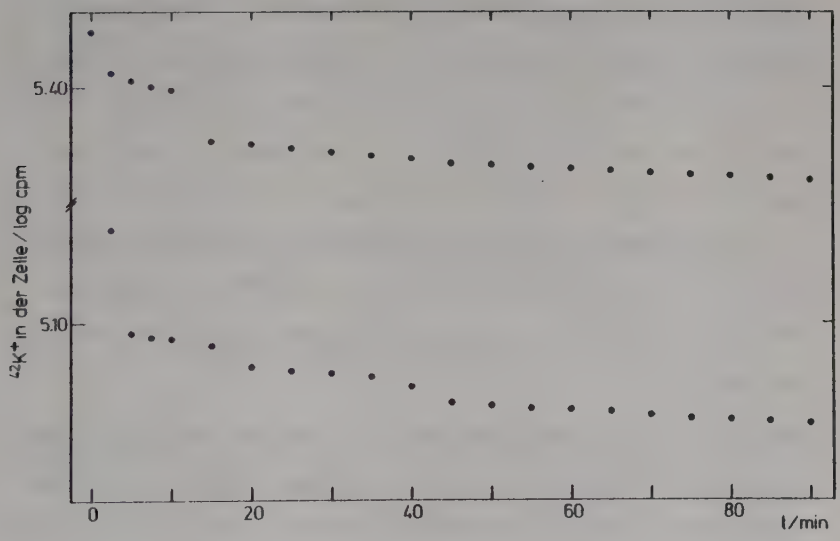


Abb. 15 : $^{42}K^+$-Abgabe bei 21°C (Licht ca. 80 W m^{-2});
2 Abgabekinetiken mit Versetzungen.
Ordinate: $^{42}K^+$ in der Zelle /log cpm; Abszisse: Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

Nach einer solchen Versetzung erfolgt die $^{42}K^+$-Abgabe mit derselben Zeitkonstanten wie vor der Versetzung. Diese auffallenden kurzfristigen Steigerungen der K^+-Abgabe im Verlaufe eines Effluxexperimentes findet man auch bei der Verwendung von $^{86}Rb^+$ als Tracer für K^+ [30]. Die Ursachen für diese K^+-Effluxsteigerungen sind in [30] ausführlich dargestellt. Es handelt sich dabei um spontane Membrandepolarisierungen, bei denen das Membranpotential, ausgehend vom Ruhepotential (ca.-170 mV), auf Spannungen absinkt, die positiver als $E_K \approx -90$ mV sind. Wird aber E_K unterschritten, wechselt der elektrochemische Gradient für K^+ das Vorzeichen (vgl. 5.1.1.1), und es kommt durch die hohe K^+-Leitfähigkeit für Ausstrom (entsprechend der hohen K^+-Innenkonzentration) zu einem drastischen vorübergehenden Netto-K^+-Efflux. Dieser erreicht im typischen Fall Spitzenwerte bis zum ca. 40-fachen des Brutto-Efflux bei RP [30].

Während der Versetzung zwischen t = 10 min und t = 15 min (Abb. 15, obere Kurve) gibt diese Zelle ($V = 1{,}9 \times 10^{-9} m^3$, $A = 25{,}6\ mm^2$, steady-state Efflux= $15{,}5 \times 10^{-8}$ Mol $K^+ m^{-2} s^{-1}$) etwa $2{,}4 \times 10^{-8}$ Mol K^+ ab. Das entspricht einem durchschnittlichen K^+-Efflux während des gesamten Zeitintervalls von 310×10^{-8} Mol $m^{-2} s^{-1}$ und damit einer 20-fachen Effluxsteigerung. Aus Wahrscheinlichkeitsgründen wird aber der gesteigerte Efflux nicht während des gesamten fraglichen Zeitintervalls stattgefunden haben. Damit muß während eines kürzeren Zeitintervalls ein noch höherer K^+-Efflux stattgefunden haben.

Tab. 3 : Abgabe von $^{42}K^+$, $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 21°C (Licht ca. 80 W m^{-2}) Mittelwerte ± S.E.

Ion	Anzahl der Exp. n	Anzahl d. Phasen d. Efflux-kinetik	Zeitkonstante der Radioaktivitäts-abgabe τ/min Komp.2	τ/h Komp.3	Rel.Verhältnis d. Radioaktivitäts-mengen in den Flußkomponenten A^*_{02} / A^*_{03}	Efflux 10^{-8} Mol m^{-2} s^{-1} Komponente 2	Komponente 3
K^+	4	1	60,5 ± 6 h			14,1 ± 1,4	
Na^+	8	2	9,5±1,5	5,1±0,4	1:4,0 ± 1	572 ± 129	21 ± 1,9
Cl^-	13	2	20,1±0,6	2,4±0,5	1:1,1 ± 0,1	1727 ± 210	230 ± 47

5.1.2.3 Efflux von $^{22}Na^+$ bei Normaltemperatur (21°)

5.1.2.3.1 Vergleich mit Influxdaten

Die Efflux-Kinetik von $^{22}Na^+$ bei Normaltemperatur Abb. 12,S.39 ist ebenso wie die entsprechende Influx-Kinetik (Abb. 8) 2-phasig. Wie in Abb. 12 gezeigt, läßt sich die Kinetik in 3 Komponenten zerlegen, von denen die Komponente 1 nach 5.1.2.2 wiederum der Abgabe von Radioaktivität aus der Zellwand zuzuordnen ist (τ_1 = 1,8 ± 0,4 min).

Als intrazelluläre Komponenten erscheinen K-2 mit τ_2 = 10,4 ± 1,4 min und K-3 mit τ_3 = 6,65 ± 1 h. K-2 tauscht $^{22}Na^+$ damit etwa doppelt so schnell aus wie

die entsprechende Influx-Komponente, während K-3 gegenüber der entsprechenden Komponente der Influx-Kinetik aus ungeklärten Gründen etwa um den Faktor 2 langsamer erscheint (vgl. Tab. 1). Im dynamischen Gleichgewicht müssen die Konstanten für die Aufnahme und die Abgabe von Ionen gleich sein. Die schnelle Komponente der Influx-Kinetik erscheint wahrscheinlich deshalb zu langsam, weil, wie unter 3.6.3 erläutert, vor den Influxversuchen der Zellwand-free-space ausgewaschen wurde. Dabei wird auch ein Teil der Radioaktivität in der Zelle mit ausgewaschen. Das führt vor allem bei kurzen Aufladezeiten dazu, den Influx zu unterschätzen, d.h. die Zeitkonstanten für die Ionenaufnahme erscheinen zu groß.

5.1.2.3.2 Fallunterscheidung

Die Efflux-Kinetik in Abb. 12 stammt von einer Zelle, die für $t_{in} > 5 \times \tau_3$ mit radioaktiv markiertem Medium inkubiert wurde. Damit ist Na^+ in dieser Zelle zu über 99% markiert. Das Verhältnis A^*_{02}/A^*_{03} sollte dann, unter der Annahme $[Na^+]_2 = [Na^+]_3$, das Volumenverhältnis dieser beiden Komponenten wiedergeben [39]. Für das Beispiel in Abb. 12 ergibt sich $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:0{,}75$. Für 8 "durchmarkierte"Zellen (bis $t_{in} > 40 \times \tau_3$) mit deutlich 2-phasiger Efflux-Kinetik, liegt der mittlere Wert bei $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:4 \pm 1$. Diese Gruppe von 8 Zellen läßt sich weiter unterteilen in zwei deutlich verschiedene Gruppen mit einmal $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:0{,}77 \pm 0{,}02$ ($n = 3$) und eine zweite Gruppe mit $A^*_{02}/A^*_{03} = 5{,}9 \pm 0{,}9$ ($n = 5$).

Die Kompartimentsanalyse zur Berechnung der Flußgrößen von vakuolisierten Pflanzenzellen [8] geht u.a. aus von der Annahme, daß K-2 die Abgabe von Radioaktivität aus dem Cytoplasma und K-3 die Abgabe von Radioaktivität aus der Vakuole wiedergibt. Diese Zuordnung läßt für Acetabularia, bei einem Volumenverhältnis Cyt./Vak. = 1:10 und $[Na^+]_{Cyt.} = [Na^+]_{Vak.} = 71$ mM [34] für A^*_{02}/A^*_{03} bei "durchmarkierten" Zellen ebenfalls ein Verhältnis von 1:10 erwarten.

Überraschenderweise zeigten von 20 untersuchten Zellen nur 2 diese Relation (1:10, bzw. 1:19). Interessant erscheint dabei, daß es sich in beiden Fällen um Zellen handelt, bei denen $[Na^+]_i \approx [Na^+]_o = 461$ mM ist. Offensichtlich ist bei diesen beiden Zellen im Verlauf der Inkubation der für die Aufrechterhaltung von $[Na^+]_i = 71$ mM erforderliche Na^+-Export zumindest zeitweise ausgefallen. (vgl. 5.1.1.2), und es kam dadurch zu einer Netto-Na^+-Aufnahme. Es besteht die Vermutung, daß das unerwartete Verhältnis von A^*_{02}/A^*_{03} bei Zellen mit intaktem Na^+-Exportsystem in Zusammenhang mit dem Na^+-Export steht.

5.1.2.3.3 Anwendbarkeit der konventionellen Kompartimentsanalyse auf den $^{22}Na^+$-Efflux bei Acetabularia

Für die Berechnung der Flußgrößen stellt sich die Frage, ob die konventionelle Kompartimentsanalyse [8] auf den $^{22}Na^+$-Efflux bei Acetabularia angewendet werden darf. Die Kompartimentsanalyse geht von folgenden Voraussetzungen aus:

1. Cytoplasma und Vakuole sind in Serie geschaltet. Ionen gelangen von Außen nur über Plasmalemma - Cytoplasma - Tonoplast in die Vakuole und können nur über denselben Weg zurückgelangen.

2. Der Gesamtionengehalt der Vakuole (für das betrachtete Ion) muß wesentlich größer sein als der des Cytoplasmas. Bei gleichen Konzentrationen in Vakuole und Cytoplasma bedeutet das, daß sich die Volumina von Vakuole und Cytoplasma entsprechend stark unterscheiden müssen (mind. 10:1).

3. Das untersuchte Objekt muß im dynamischen Gleichgewicht sein; der Netto-Fluß ist = 0.

4. Die Auswaschkinetik zeigt in halblogarithmischer Darstellung 3 Komponenten mit deutlich unterschiedlichen Zeitkonstanten. Diese 3 Komponenten lassen sich durch das erwähnte (3.6.2) Subtraktionsverfahren voneinander trennen und werden in der Reihenfolge größer werdender Zeitkonstanten folgenden Flußkompartimenten zugeordnet: Komponente 1 (schnellster Austausch) = Zellwand-free-space, Komponente 2 = Cytoplasma, Komponente 3 = Vakuole.

zu 1. :

Aus einer Efflux-Kinetik wie in Abb. 12 ist die Anordnung der intrazellulären Flußkomponenten nicht zu ersehen [8]. K-2 und K-3 können "in-Serie" geschaltet sein, aber die

bereits erwähnten Beispiele von Zellen mit $[Na^+]_i \approx [Na^+]_o$ geben einen Hinweis darauf, daß durchaus auch andere Anordnungen in Betracht gezogen werden müssen (Tab. 4). So ist z.B. ein direkter Ionenaustausch zwischen Außenmedium und Vakuole denkbar [9,27,31].

Tab. 4 : Anstieg der radioaktiven Spezifität ($S^*_{2,3}/S^*_o$) in K-2 und K-3 bei 2 Zellen mit $[Na^+]_i \approx [Na^+]_o$.

Zelle	t_{in} / h	A^*_{02}/A^*_{03}	S^*_2/S^*_o	S^*_3/S^*_o	$INaI_i$ / mM	$INaI_o$ / mM	τ_2(Influx) / h
1	24,3	1:19	0,486	1,026	473	461	36,5
2	44,0	1:10	0,790	0,911	420	461	28,2

Wie Tab. 4 zeigt, ist Komponente 3 (Vakuole ?) bei beiden Zellen "durchmarkiert", während Komponente 2 (Cytoplasma ?) auch nach t_{in} = 44 h noch nicht $S^*_2 = S^*_o$ erreicht hat. Ist die Zuordnung K-3 = Vakuole und K-2 = Cytoplasma richtig, so heißt das, daß die radioaktiv markierten Ionen von Außen über die Vakuole in das Cytoplasma gelangen. Damit muß ein direkter Ionenaustausch zwischen Vakuole und Außenmedium gefordert werden.
Extrapoliert man A^*_{02}/A^*_{03} auf $t_{in} = \infty$, so ergibt sich für beide Zellen ein Verhältnis von 1:10, wie es für K-2 = Cytoplasma und K-3 = Vakuole erwartet wird [34].

Aus

$$A_2^*(t) = A_{\infty 2}^*(1 - \exp -t_{in}/\tau_2) \qquad (5)$$

läßt sich mit $A_2^*(t) = S_2^*(t)$ und $A_{\infty 2}^* = S_0^*$ die Zeitkonstante der Aufladung von K-2 berechnen. Sie beträgt für die Zelle 1 (Tab. 4) τ = 36,5 h und für Zelle 2 τ = 28,2 h. Diese beiden recht gut übereinstimmenden Zeitkonstanten sind ein weiterer Hinweis darauf, daß es sich in beiden Fällen um den gleichen Aufladevorgang handelt.

zu 2. :

Aus dem Isotopengehalt ($A_{02}^* + A_{03}^*$) der "durchmarkierten" Zellen läßt sich leicht die intrazelluläre Konzentration des untersuchten Ions ausrechnen. Für Na^+ ergibt sich aus den Effluxexperimenten $[Na^+]_i$ = 80 ± 10 mM. Dieser Wert stimmt mit dem von SADDLER [34] gefundenen Wert $[Na^+]_i$ = 71 ± 9 mM überein und bestätigt damit die Zuverlässigkeit der Meßmethoden beider Autoren (3.6.2). Entspricht das Verhältnis A_{02}^*/A_{03}^* nicht dem erwarteten Verhältnis von Cytoplasma zu Vakuole, so kann das auf unterschiedliche Konzentrationen des untersuchten Ions in den Flußkomponenten zurückzuführen sein.

Folgende Aufstellung (Tab. 5) zeigt, welche Konzentrationsunterschiede zwischen Cytoplasma und Vakuole für verschiedene A_{02}^*/A_{03}^* zu fordern sind, wenn $[Na^+]_i$ = 80 mM; K-2 = Cytoplasma, K-3 = Vakuole und Cytoplasma/Vakuole = 1:10 ist.

Tab. 5 : Abschätzung der Na^+-Konzentrationen in Cytoplasma und Vakuole für gegebene A^*_{02}/A^*_{03} bei $[Na^+]_i$ = 80 mM und K-2 = Cytoplasma, sowie K-3 = Vakuole; $V_{Cyt.}/V_{Vak.}$ = 1:10

A^*_{02} / A^*_{03}	"$[Na]$"$_{Cyt}$ mM	"$[Na]$"$_{Vak}$ mM	$[Na]_i$ mM
1 : 10	80	80	80
1 : 5,9	127	75	80
1 : 4	176	70	80
1 : 1	440	44	80
1 : 0,77	497	38	80

Obwohl nach [34] $[Na^+]_{Cyt.} \approx [Na^+]_{Vak.}$ = 57 ± 5 bzw. 62 ± 2,5 mM ist, läßt sich A^*_{02}/A^*_{03} = 1:5,9 bei $V_{Cyt.}/V_{Vak.}$ = 1:10 gerade noch mit $[Na^+]_{Cyt.}$ = 127 mM und $[Na^+]_{Vak.}$ = 75 mM erklären. Aber bereits für Verhältnisse A^*_{02}/A^*_{03} von 1: ≙ 4 erscheinen die zu fordernden Na^+-Konzentrationen im Cytoplasma viel zu hoch (vgl. Tab. 5), wenngleich solche hohen Na^+-Konzentrationen nicht auszuschließen sind.

Daraus läßt sich folgern, daß entweder das Verhältnis der Volumina von Cytoplasma und Vakuole kleiner als 1:10 ist, oder aber K-2 und K-3 nicht dem Cytoplasma bzw. der Vakuole zugeordnet werden können.

In beiden Fällen sind die Voraussetzungen für die Anwendung der konventionellen Kompartimentsanalyse bei Acetabularia nicht erfüllt.

zu 3. :

Bei den Effluxexperimenten ohne simultane Spannungsmessung wurde die Bedingung des dynamischen Gleichgewichtes nicht verletzt.

zu 4. :

Die Efflux-Kinetik von $^{22}Na^{+}$ bei NT läßt sich in 3 Komponenten mit unterschiedlichen Zeitkonstanten zerlegen. Nur Komponente 1 kann eindeutig dem Zellwand-free-space zugeordnet werden. Aus oben angeführten Gründen ist die Zuordnung: K-2 = Zellkompartiment "Cytoplasma" und K-3 = Zellkompartiment "Vakuole" nicht zweifelsfrei möglich.

5.1.2.3.4 Ergebnisse der $^{22}Na^{+}$-Effluxmessungen

Für die Anwendung der konventionellen Kompartimentsanalyse auf den Efflux vakuolisierter Pflanzenzellen werden Inkubationszeiten gewählt, die mindestens 5 x $t1/2_{Cyt.}$, aber wesentlich kleiner als $t1/2_{Vak.}$ sind [8]. Das heißt: zu Beginn des Auswaschens wäre das Cytoplasma zu über 95% markiert, gegenüber einer sehr geringen radioaktiven Spezifität in der Vakuole. Die rechnerische Behandlung der Abgabedaten mit Hilfe der konventionellen Kompartimentsanalyse berücksichtigt daher die Abwanderung von Radioaktivität vom Cytoplasma in die Vakuole während des Auswaschens.

Da die Voraussetzungen für die Anwendung der Kompartimentsanalyse auf den $^{22}Na^+$-Efflux bei NT für Acetabularia nicht eindeutig gegeben sind, beruhen die folgenden Flußberechnungen ausschließlich auf den Daten voll "durchmarkierter" Zellen. Ist nämlich $S^*_2 = S^*_3 = S^*_0$, so kann S^*_3 nicht mehr steigen während K-2 ausgewaschen wird.

In Tab. 6 sind die Ergebnisse der $^{22}Na^+$-Effluxmessungen nach unterschiedlichen A^*_{02}/A^*_{03} aufgegliedert. Die Flußwerte beziehen sich jeweils auf die Zelloberfläche.

Die beiden Gruppen mit $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:0,77$ und $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:5,9$ unterscheiden sich nur in Bezug auf Φ_2 signifikant voneinander ($p < 0,05$). Φ_2 der Gruppe mit $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:5,9$ entspricht mit $245 \pm 63 \times 10^{-8}$Mol $Na^+m^{-2}s^{-1}$ sehr gut den $230 \pm 26 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$ während der schnellen Anfangskomponente der $^{22}Na^+$-Aufnahme bei NT (vgl. Tab. 1), während die Gruppe mit $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:0,77$ einen ca. 3-fach höheren Wert zeigt. Dagegen weisen beide Gruppen mit $\Phi_3 = 15 \pm 4 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$ bzw. $19 \pm 2 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$ etwa den gleichen Efflux aus K-3 auf, der gut dem Influx während der langsamen $^{22}Na^+$-Aufnahme ($20,2 \pm 2,4 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$; Tab. 1) entspricht.

Damit ist, mit Ausnahme der 3 Zellen mit $A^*_{02}/A^*_{03} = 1:0,77$, die Bedingung des dynamischen Gleichgewichts für die Na^+-Flüsse bei Acetabularia erfüllt.(5.1.2.3.1, Punkt 3).

5.1.2.3.5 $^{22}Na^+$-Efflux von nicht-vakuolisierten Zell-"Stummeln"

Zell-"Stummel"(ST) von Acetabularia enthalten fast ausschließlich den Cytoplasma-Anteil einer "Normalzelle" (NZ) (Präparation siehe 3.8). Ist auch die Bildung neuer Vakuolen nach der Zentrifugation und während der Inkubation nicht auszuschließen, so machten diese neuen Vakuolen zum Zeitpunkt des Effluxexperimentes schätzungsweise weniger als 1% des ST-Volumens aus. Abgesehen von dieser Einschränkung, handelt es sich also um Effluxmessungen an einem vakuolenfreien Kompartimentsystem.

Da die Inkubation mit großen Radioaktivitätskonzentrationen von $^{22}Na^+$ (20 - 60 Ci m^{-3}) häufig und besonders bei zentrifugierten Zellen zu Schädigungen der Algen führte, wurde bei den Effluxversuchen an STn simultan die Membranspannung als Parameter für den physiologischen Zustand der Zellen registriert. Leider gelang es nur in 2 Fällen, an nicht geschädigten STn zu messen.

Die $^{22}Na^+$-Efflux-Kinetiken von STn sind erwartungsgemäß 1-phasig (Efflux aus einem einzelnen Zellkompartiment). Die ST geben $^{22}Na^+$ mit einer Zeitkonstanten von τ_{ST}= 49,5 ± 2,5 min ab. Das entspricht einem mittleren Na^+-Efflux von 484 ± 20 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ (Tab. 6).

Dieser Wert liegt im Bereich der mittleren Werte für Φ_2 der NZ und ist wesentlich höher als Φ_3 der NZ (Tab. 6). Daher scheint die Annahme berechtigt, das K-2 der NZ im Cytoplasmakompartiment der Acetabularia-Zellen enthalten

ist. Dieser Punkt wird unter 6.2.3.2.3 ausführlich diskutiert.

Tab. 6 : $^{22}Na^{+}$-Efflux bei 21°C, Normalzellen (NZ) und "Stummel"(ST); Licht:ca. 80 W m^{-2} (Mittelwerte ±S.E.)

Zelle	Anzahl der Exp. n	Zeitkonstante der Radioaktivitätsabgabe τ/min Komp.2	τ/h Komp.3	Rel.Verhältnis d. Radioaktivitätsmengen in den Flußkomponenten A°_{02} / A°_{03}	Efflux 10^{-8} Mol m^{-2} s^{-1} Komponente 2	Komponente 3	Na^{+}-Konz. in der Zelle c_i/mM
NZ	3	10,4±2,6	6,4±1,8	1:0,77 ± 0,02	703 ± 134	15 ± 4	73±12
NZ	5	8,2±1,4	9,0±1,5	1:5,9 ± 0,9	245 ± 63	19 ± 2	84±16
NZ(X)	8	8,6±1,1	8,1±1,2	1:4,0 ± 1	417 ± 102	17 ± 2	80±10
ST	2	49,5 ± 20 min			484 ± 20		165±37

5.1.2.3.6 Chloroplasten als Flußkompartiment

Neben dem Grundcytoplasma enthalten die ST v.a. noch die Chloroplasten (Abb.42), die auch als intrazelluläre Flußkomponenten in Frage kommen. Da aber die Effluxkinetiken der ST 1-phasig sind (längste Auswaschzeit 1 h), treten die Chloroplasten nicht als getrenntes Flußkompartiment auf. Der Na^{+}-Austausch zwischen Chloroplasten und Cytoplasma muß daher entweder mit ungefähr der gleichen oder einer schnelleren Zeitkonstanten erfolgen wie der Austausch zwischen Cytoplasma,

und Außenmedium, sodaß er flußkinetisch nicht davon zu trennen ist, oder er erfolgt mit einer Zeitkonstanten, die wesentlich länger ist und daher in den Experimenten nicht erfaßt wird. Dieser Fall kann ausgeschlossen werden, da dann in den Effluxkinetiken der NZ eine vierte Komponente auftauchen müßte. Außerdem würde sich für die Na^+-Konzentration im Grundcytoplasma ein viel zu hoher Wert ergeben. Die Chloroplasten verhalten sich demnach flußkinetisch als Teil des Zellkompartiments Cytoplasma.

5.1.2.3.7 Vergleich: Cytoplasma - Vakuole

Die Na^+-Konzentration im Cytoplasma der ST (Tab. 6) erscheint höher als die des Cytoplasmas von NZ [34]. Dies kann auf eine Netto-Na^+-Aufnahme als Folge der Präparation oder auf die Beeinträchtigung des aktiven Na^+-Exports (vgl. 5.1.1.2) zurückzuführen sein. Ist aber die tatsächliche Na^+-Konzentration im Cytoplasma doch größer als durch bisherige Methoden ermittelt [34], so lassen sich mit $[Na^+]_{Cyt.}$ = 165 mM und $[Na^+]_i$ = 80 mM (Tab. 6), bei einem tatsächlichen Volumenverhältnis von Cytoplasma:Vakuole = 1:5 (s.o.), auch Werte von A^*_{02}/A^*_{03} = 1:1 erklären (vgl. Tab. 5). Für dieses Volumenverhältnis errechnet sich bei einer Acetabularia-Zelle mit mittlerem Protoplastenradius $r = 0{,}15 \times 10^{-3}$ m die Dicke der Cytoplasmaschicht zu $d_{Cyt} = 15 \times 10^{-6}$ m (vgl. Abb. 41).

5.1.2.4 Efflux von $^{36}Cl^-$ bei Normaltemperatur (21°C)

Wie auf Grund des Verlaufes der $^{36}Cl^-$-Influx-Kinetik bei NT (Abb. 8) erwartet, ist die Efflux-Kinetik von $^{36}Cl^-$ bei NT ebenfalls 2-phasig (Abb. 16). Komponente 1 mit τ_1= 1,2 min gibt auch in diesem Falle die Abgabe von Radioaktivität aus dem Zellwand-free-space wieder (Abb. 16 C). Auffallend ist wiederum die große Radioaktivitätsmenge in K-2. Das Verhältnis

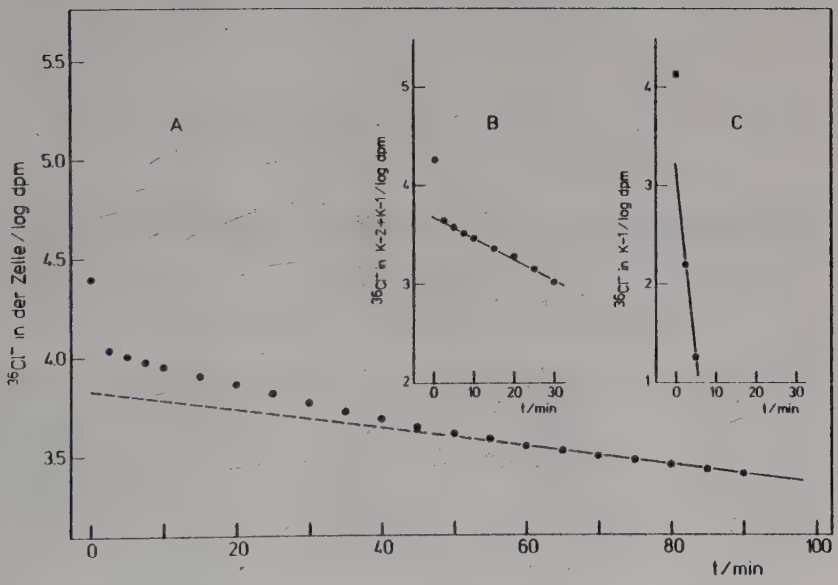


Abb. 16 : $^{36}Cl^-$-Abgabe bei 21°C (Licht ca. 80 W m^{-2})

A: $^{36}Cl^-$ in der Zelle /(log dpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

B: $^{36}Cl^-$ in den Flußkomponenten K-2 + K-1 /(log dpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

C: $^{36}Cl^-$ in der Flußkomponente K-1 /(log dpm) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

der beiden Flußkomponenten K-2 (mit τ_2= 20,1 ± 0,6 min) und K-3 (mit τ_3= 2,4 ± 0,5 h) ist A^*_{02}/A^*_{03} = 1:1,1 ± 0,2. Damit unterscheidet es sich noch deutlicher als bei Na^+ (5.1.2.3.1; Tab. 6) von dem erwarteten Wert 1:10.

Mit den Annahmen: Cytoplasma:Vakuole = 1:10, K-2 = Cytoplasma, K-3 = Vakuole und $[Cl^-]_i \approx$ 500 mM, errechnet sich eine Cl^--Konzentration im Cytoplasma von 2,75 M und in der Vakuole von 275 mM. Eine derart hohe Cl^--Konzentration im Cytoplasma widerspricht offenbar den Messungen [34].

Tab. 7: $^{36}Cl^-$-Efflux bei 21°C; Normalzellen und zentrifugierte Zellen (Mittelwerte ± S.E.)

Zelle	Anzahl der Exp. n	Zeitkonstante der Radioaktivitätsabgabe τ/min Komp.2	τ/h Komp.3	Rel.Verhältnis d. Radioaktivitätsmengen in den Flußkomponenten A^*_{02} / A^*_{03}	Efflux 10^{-8} Mol m^{-2} s^{-1} Komponente 2	Komponente 3	Cl^--Kons. in der Zelle c_i/mM
NZ	10	18,7±0,9	2,7±0,3	1:1,1 ± 0,1	1727 ± 210	230 ± 47	412± 53
ST	4	128 ± 15 min			550 ± 154		417±117
SH	2	214 ± 91 min			156 ± 22		230± 54

Damit kann für das intrazelluläre Cl^- keine 1:10 Kompartimentierung vorliegen. Demzufolge darf die Kompartimentsanalyse auch auf die Cl^--Flüsse von Acetabularia nicht angewendet werden. Aus diesem Grunde beruhen die in Tab. 7 zusammengefaßten Ergebnisse des Cl^--Efflux bei NT ebenfalls (vgl. 5.1.2.3.3) auf den Effluxdaten voll "durchmarkierter" Zellen (Inkubationsdauer bis t_{in}= 620 h ≙ 260 x τ_3).

Die Tabelle 7 zeigt, daß Φ_2 mit 1727 ± 210 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ auffallend groß ist (ca. 4 mal größer als der mittlere Na^+-Efflux aus K-2). Die Summe des Efflux der Kationen K^+ und Na^+ reicht nicht aus, um diesen hohen Anionenefflux elektrisch zu kompensieren (vgl. Tab. 3; Tab. 6). Damit scheint zunächst die Bedingung der Elektroneutralität (die Summe der unidirektionellen Ladungsflüsse von Kationen und Anionen ist = 0) verletzt (siehe dazu auch 5.1.2.3.3). Dieses Problem wird an anderer Stelle (6.2.3) erörtert.

Der $^{36}Cl^-$-Efflux aus K-3, Φ_3 = 230 ± 47 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$, liegt in der Größenordnung des Na^+-Efflux aus K-2 (Tab. 6) und kann damit als elektrisch etwa kompensiert gelten.

Ein Vergleich der Ergebnisse in Tab. 7 mit den Cl^--Influxwerten aus Tab. 1 zeigt, daß auch für die Cl^--Flüsse bei Acetabularia die Gleichgewichtsbedingung Influx = Efflux erfüllt ist.

5.1.2.4.1 $^{36}Cl^-$-Efflux von nicht-vakuolisierten Zell-"Stummeln" und cytoplasmafreien Zell-"Schläuchen".

Zur Klärung der Frage, welchen intrazellulären Kompartimenten die Flußkomponenten K-2 und K-3 der $^{36}Cl^-$-Effluxkinetik zuzuordnen sind, wurden Effluxexperimente an nicht-vakuolisierten "Stummeln"(ST) und cytoplasmafreien "Schläuchen" (SH) gemacht (zur Präparation siehe 3.8). Auch bei diesen Experimenten wurden (wie beim $^{22}Na^+$-Efflux von STn, 5.1.2.3.5) die Zellabschnitte durch gleichzeitiges Registrieren der Membranspannung auf einwandfreien physiologischen Zustand

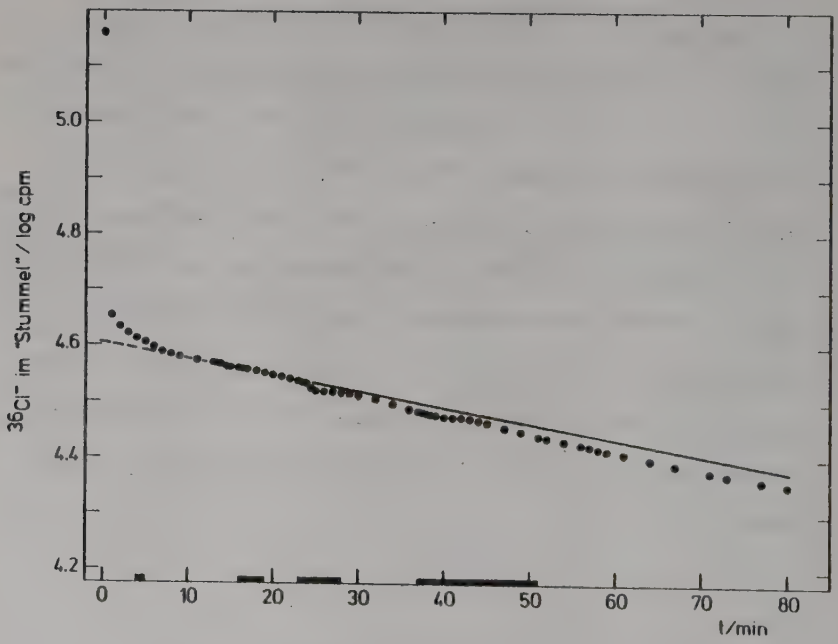


Abb. 17 : "Stummel", $^{36}Cl^-$-Effluxkinetik bei 21°C

Abszisse: Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min); zur Bedeutung des Lichtprogramms siehe 5.2.3.2

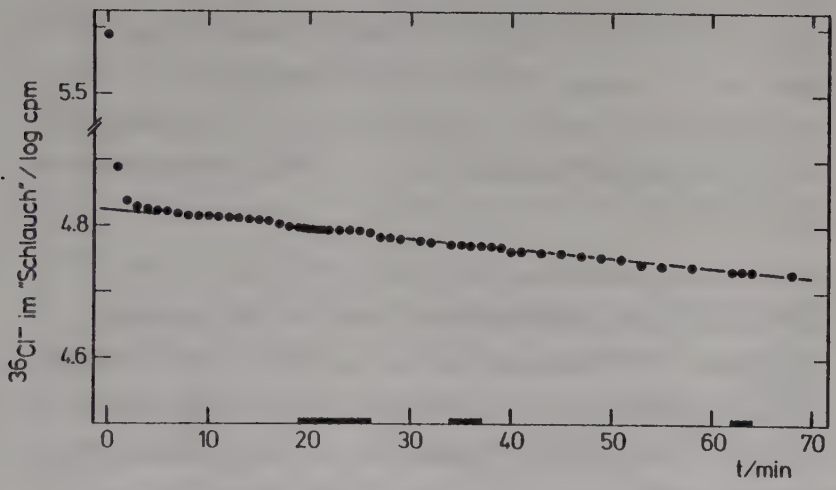


Abb. 18 : "Schlauch", $^{36}Cl^-$-Effluxkinetik bei 21°C

Abszisse: Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min); zur Bedeutung des Lichtprogramms siehe 5.2.3.3

Die Effluxkinetiken von STn und SHn sind 1-phasig (Abb. 17, "Stummel" und Abb. 18, "Schlauch"). Die Ergebnisse der $^{36}Cl^-$-Effluxmessungen an NZn, Stn und SHn sind in Tab. 7 zusammengefaßt.

Die ST geben $^{36}Cl^-$ mit einer Zeitkonstanten τ_{ST} = 128 ± 15 min ab, während die Zeitkonstante für die $^{36}Cl^-$-Abgabe bei SHn mit τ_{SH} = 214 ± 91 min etwa doppelt so groß ist.

Weder ST noch SH zeigen einen so extrem hohen Cl^--Efflux wie Φ_2 der NZ. Die Summe des Efflux von ST und SH macht nicht einmal die Hälfte des Cl^--Efflux einer NZ aus. Damit liegt die Vermutung nahe, daß ein wesentlicher Teil des Cl^--Transportsystems von Acetabularia nur im Zusammenspiel von Cytoplasma und Vakuole einer intakten Zelle funktionsfähig ist.

Tab. 7 zeigt weiterhin, daß NZn und ST etwa gleiche Cl^--Konzentrationen aufweisen, wobei bei STn größere individuelle Unterschiede auftreten können. Die durch die Isotopenmarkierung gefundenen Werte für die Cl^--Konzentration in NZn und STn stimmen gut mit den von SADDLER [34] gefundenen 495 ± 15 mM für die gesamte Zelle überein. Die Cl^--Konzentration in den SHn ist dagegen auf ca. 60% des Wertes für NZn reduziert. Dies läßt sich möglicherweise auf eine Schädigung des Cl^--Transportsystems durch die Zentrifugation zurückführen und muß nicht unbedingt die Verhältnisse einer NZ wiederspiegeln.

Damit lassen sich für Cl^- bei A^*_{02}/A^*_{03} = 1:1 und K-2 = Cytoplasma, sowie K-3 = Vakuole weder Volumenverhältnisse Cytoplasma:Vakuole = 1:10 noch 1:5 erklären. Das bedeutet, daß die flußkinetische Kompartimentierung des Cl^- bei Acetabularia nicht mit der Kompartimentierung Cytoplasma - Vakuole übereinstimmt. Alternative flußkinetische Modelle, die zunächst den besonderen Verhältnissen bei Acetabularia gerecht werden, sollen in der Diskussion dargestellt werden.

5.1.2.5 Efflux von $^{22}Na^+$ bei 4^oC

5.1.2.5.1 Vergleich des $^{22}Na^+$-Efflux bei 4^o und bei 21^o; 2-phasige Efflux-Kinetiken

Von insgesamt 40 $^{22}Na^+$-Effluxexperimenten bei 4^oC sollen hier die Ergebnisse 14 "durchmarkierter" Zellen dargestellt werden.

Die Mehrzahl dieser $^{22}Na^+$-Abgabekinetiken bei 4^oC verläuft deutlich 2-phasig (Abb. 19; Tab. 8). Gegenüber den Verhältnissen bei NT (vgl. Tab. 6) erscheint die Abgabe von $^{22}Na^+$ aus K-3 etwas erhöht ($24 \pm 4{,}4 \times 10^{-8}$ Mol $Na^+ m^{-2}s^{-1}$ bei 4^oC, $17 \pm 2 \times 10^{-8}$ Mol $Na^+ m^{-2}s^{-1}$ bei NT). Diese Effluxsteigerung ist zwar statistisch nicht signifikant, sie kann aber dennoch auf die bei 4^oC erhöhte Membranpermeabilität für Na^+ zurückzuführen sein [35].

Demgegenüber ist $\tau_{2,4^o}$ im Vergleich zu $\tau_{2,NT}$ deutlich verlangsamt und $\Phi_{2,4^o}$ erreicht mit $344 \pm 73 \times 10^{-8}$ Mol $Na^+m^{-2}s^{-1}$ nur etwa 80% des mittleren Wertes für Φ_2 bei NT (vgl.Tab. 8 und Tab. 6).

Abb. 19 zeigt diesen Sachverhalt am Beispiel einer $^{22}Na^+$-Efflux-Kinetik bei NT (Abb.19,obere Kurve) und einer $^{22}Na^+$-Efflux-Kinetik bei 4^oC (Abb. 19, untere Kurve). Dabei sind die beiden Zeitkonstanten $\tau_{3,4^o}$ und $\tau_{3,NT}$ annähernd gleich, dagegen ist $\tau_{2,4^o}$ gegenüber $\tau_{2,NT}$ in diesem Beispiel um mehr als den Faktor 2 verlangsamt (Abb. 19 B).

Während also die Inkubation bei $4^{o}C$ kaum eine Wirkung auf δ_3 zeigt, ist der Efflux aus K-2 in der Kälte deutlich reduziert. Auch das Verhältnis A^*_{02}/A^*_{03} bei $4^{o}C$ unterscheidet sich mit durchschnittlich 1:1,8 ± 0,4 auffallend von dem bei NT (im Mittel 1:5,9 ± 0,9).

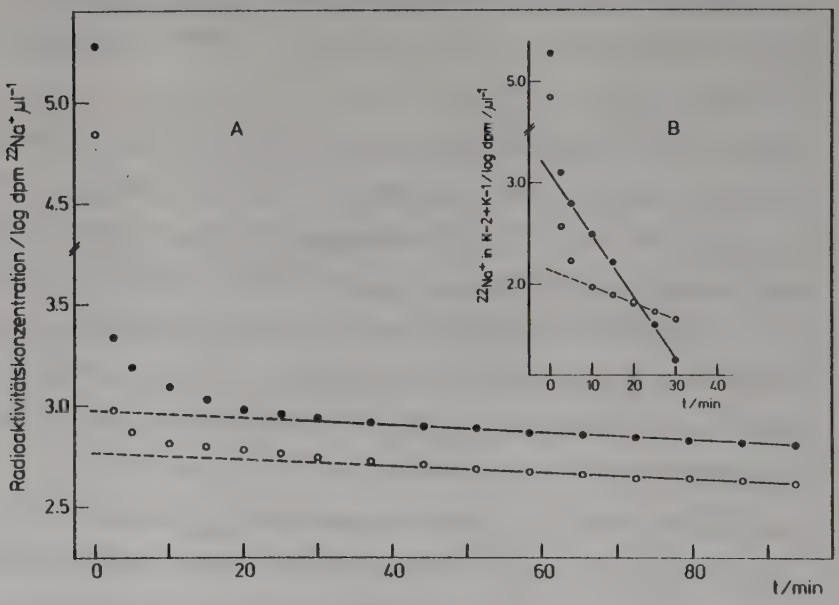


Abb. 19 : $^{22}Na^+$-Abgabe bei $21^{o}C$ ( ) und bei $4^{o}C$ ( )

A: $^{22}Na^+$ in der Zelle /(log dpm μl^{-1}) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

B: $^{22}Na^+$ in den Flußkomponenten K-2 + K-1 /(log dpm μl^{-1}) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

5.1.2.5.2 1-phasige Efflux-Kinetiken

Neben den oben beschriebenen 2-phasigen $^{22}Na^+$-Efflux-Kinetiken zeigen einige Zellen (6 von 14 "durchmarkierten" Zellen) 1-phasige Efflux-Kinetiken bei 4^oC. Bei diesen Kinetiken fehlt ausnahmslos die schnelle Komponente 2 der 2-phasigen Kinetiken und der Efflux solcher Zellen entspricht dem Efflux Φ_3 der 2-phasigen Kinetiken (Tab. 8).

Interessanterweise zeigen diese Zellen mit 1-phasiger Efflux-Kinetik gegenüber denen mit 2-phasiger Efflux-Kinetik eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Na^+-Innenkonzentration von 120 ± 19 mM, gegenüber 82 ± 18 mM (Tab. 8). Dies muß die Folge einer Netto-Na^+-Aufnahme sein, und das wiederum deutet daraufhin, daß bei den Zellen mit 1-phasiger Efflux-Kinetik mit der Komponente 2 des Effluxes ein wesentlicher Bestandteil des Na^+-Exportsystems ausgefallen ist.

5.1.2.5.3 $^{22}Na^+$-Abgabe nach kurzen Inkubationszeiten, ($t_{in} \leq \tau_2$)

Efflux-Kinetiken von Zellen, die nur sehr kurz in radioaktivem Medium inkubiert worden sind, zeigen häufig (8 Zellen von 15) deutliche "Schultern" in ihrem Verlauf. Das heißt, die Radioaktivitätsabgabe folgt nicht einer einfachen Exponentialfunktion, wie das bei diesen kurzen Inkubationszeiten zu erwarten wäre. Die Darstellung der Efflux-Raten als $\log(cpm\ min^{-1})$ solcher Zellen(Abb. 20) macht den beobachteten Effekt besonders deutlich.

Tab. 8 : Efflux von $^{22}Na^+$ und $^{36}Cl^-$ bei 4°C.
(Mittelwerte ± S.E.)

Ion	Anzahl der Exp.	Anzahl d. Phasen d. Efflux-kinetik	Zeitkonstante der Radioaktivitäts-abgabe		Rel. Verhältnis d. Radioaktivitäts-mengen in den Flußkomponenten	Efflux 10^{-8} Mol m^{-2} s^{-1}		Ionen-konz. in der Zelle c_i/mM
	n		τ/min Komp.2	τ/h Komp.3	$A_{02}^{\circ} / A_{03}^{\circ}$	Komponente 2	Komponente 3	
Na^+	8	2	13,5±1,1	4,7±0,5	1: 1,8 ± 0,4	344 ± 73	24 ± 4,4	82±18
Na^+	6	1	13,3 ± 4,2 h			19,8 ± 2		120±19
Cl^-	3	2	28,8±5,6	10,9±1,4	1:13 ± 4,5	189 ± 50	91 ± 13	284± 4
Cl^-	10	1	9,2 ± 1,2 h			131 ± 23		248±27

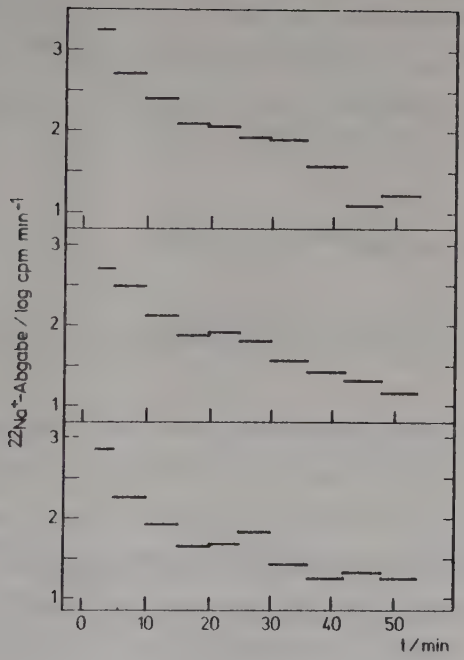


Abb. 20 : 3 Beispiele für die $^{22}Na^+$-Abgabe/(log cpm min^{-1}) bei 4^oC nach t_{in} = 5 min. Abszisse: Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

Wie Abb. 20 zeigt, sinkt die Radioaktivitätsabgabe zunächst entsprechend der sinkenden radioaktiven Spezifität in der Zelle, um nach ca. 15 - 20 min für etwa 10 - 15 min wieder anzusteigen, oder doch zumindest konstant zu bleiben. Anschließend folgt die Radioaktivitätsabgabe wieder einer einfachen Exponentialfunktion; es können aber wiederholt solche Abgabesteigerungen auftreten (Abb. 20, oben und unten).

Dieses Phänomen könnte ein Schlüssel zur Klärung der Flußkompartimentierung der Acetabularia-Zelle sein. Da diese Effluxsteigerungen bei dem 4°C-Efflux von $^{36}Cl^-$ noch wesentlich ausgeprägter sind, werden sie dort diskutiert (6.2.2).

5.1.2.6 Efflux von $^{36}Cl^-$ bei 4°C

5.1.2.6.1 Vergleich des $^{36}Cl^-$-Efflux bei 4°C und bei 21°C

Überraschenderweise lieferten rund 80% aller mit $^{36}Cl^-$ "durchmarkierten" Zellen bei 4°C 1-phasige Efflux-Kinetiken (Abb. 21, obere Kurve; Abb. 22). Das ist umso erstaunlicher, als 1-phasige Efflux-Kinetiken bei $^{22}Na^+$ unter den gleichen Bedingungen allenfalls zu 50% auftreten und beide Ionen bei 21°C 2-phasige Efflux-Kinetiken zeigen.

Aus den wenigen 2-phasigen $^{36}Cl^-$-Effluxkinetiken bei 4°C errechnet sich ein Verhältnis A^*_{02}/A^*_{03} = 1:13 (Tab. 8), gegenüber A^*_{02}/A^*_{03} = 1:1,1 bei NT.

Der aus diesen Experimenten ermittelte Cl^--Efflux aus K-2 der 2-phasigen Efflux-Kinetiken ist in der Kälte drastisch reduziert und erreicht nur ca. 10% des entsprechenden Cl^--Efflux bei NT (189 ± 50 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ bei 4°C, gegenüber 1727 ± 210 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ bei NT; vgl. Tab. 8 und Tab. 3).

Der Efflux aus K-3 der Zellen mit 2-phasiger Efflux-Kinetik repräsentiert etwa den Efflux aus Zellen mit 1-phasiger Auswaschkinetik. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Ergebnissen des $^{22}Na^+$-Efflux bei 4°C (Tab. 8).

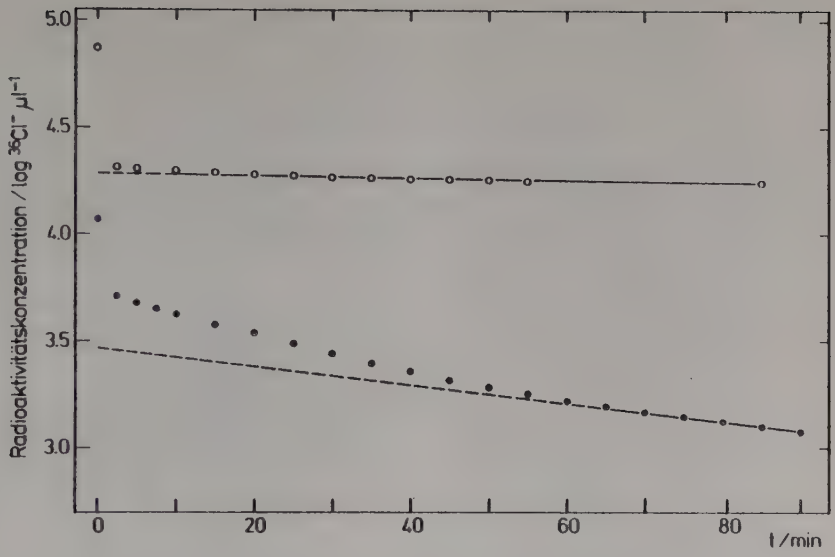


Abb. 21 : $^{36}Cl^-$- Abgabe bei 21°C ( ) und bei 4°C ( ) $^{36}Cl^-$ in der Zelle /(log cpm µl^{-1}) in Abhängigkeit von der Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

Die Cl^-- Konzentration in Acetabularia ist bei 4°C auf 50 - 60% des Wertes bei NT [34] herabgesetzt (Tab. 8). Dieses Ergebnis verifiziert die diesbezügliche Vermutung von SADDLER [36].

5.1.2.6.2 $^{36}Cl^-$- Efflux-Kinetiken mit "Schulter"

Wie für $^{22}Na^+$ unter 5.1.2.5.3 beschrieben, treten auch beim $^{36}Cl^-$- Efflux in der Kälte "Schultern" im Verlaufe der sonst 1-phasigen Kinetiken auf (bei 70% der 1-phasigen

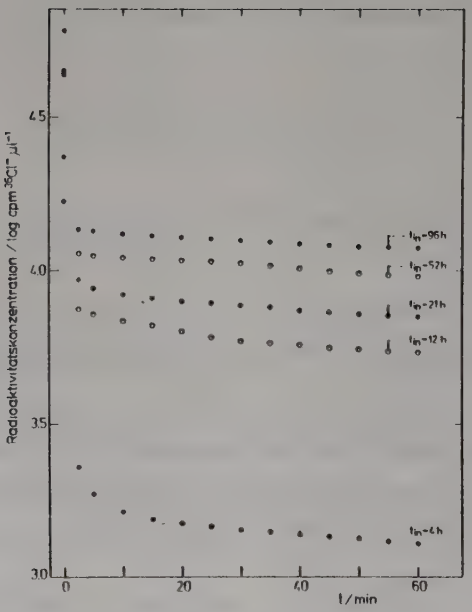


Abb. 22 : $^{36}Cl^-$- Abgabe bei 4°C nach unterschiedlicher Inkubationsdauer (t_{in}).
Ordinate: $^{36}Cl^-$- Radioaktivitätskonzentration /(log cpm μl^{-1});
Abszisse: Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

$^{36}Cl^-$- Abgabekinetiken). Allerdings handelt es sich, im Gegensatz zu den $^{22}Na^+$- Kinetiken, in diesen Fällen um Effluxkinetiken "durchmarkierter" Zellen.

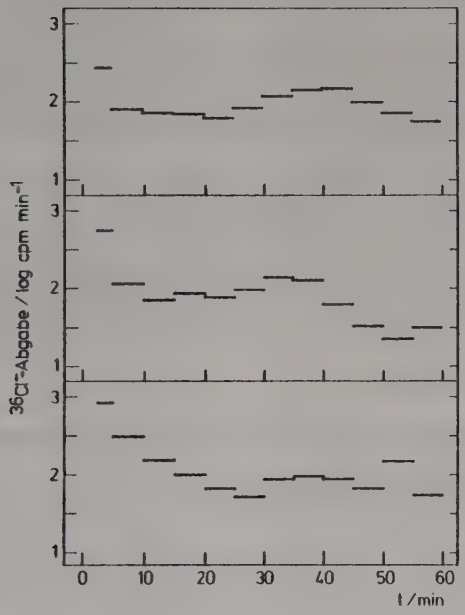


Abb. 23 : 3 Beispiele für die $^{36}Cl^-$- Abgabe /(log cpm min^{-1}) bei 4°C von "durchmarkierten" Zellen.
Abszisse: Zeit nach Beginn des Auswaschens (t/min).

In Abb. 23 sind 3 Beispiele dargestellt. Wieder ist der Logarithmus der Efflux-Raten, log cpm min^{-1}, gegen die Zeit nach Beginn des Auswaschens aufgetragen. Wesentlich deutlicher als im Falle des $^{22}Na^+$ (Abb. 20) sind hier die Abgabesteigerungen zu erkennen. Sie treten wiederum 10 - 15 min nach Beginn des Auswaschens ein (Abb. 23, oben und

Mitte) und erreichen ca. 30 min später ein erstes Maximum. Diesem ersten Maximum kann mindestens noch ein weiteres folgen (Abb. 23, Mitte und unten).

Im Verlaufe dieser Abgabesteigerungen erreicht der Cl^--Efflux Werte, die bis zum 2-fachen des mittleren Brutto-Efflux der Zellen betragen können.

Ein Vergleich mit den $^{22}Na^+$- Abgaberaten in Abb. 20 zeigt zwar quantitative Unterschiede, aber einen ähnlichen zeitlichen Verlauf der Radioaktivitätsabgabe. Dabei erscheinen die Maxima der $^{22}Na^+$- Abgabe etwas früher als die der $^{36}Cl^-$- Abgabe.

Diese Abgabesteigerungen im Verlaufe eines Auswasch-experimentes, die grundsätzlich verschieden sind von den Versetzungen im Verlaufe der $^{42}K^+$- Abgabe (vgl. Abb. 15), können einen Hinweis auf einen direkten Ionenaustausch zwischen Außenmedium und Vakuole darstellen [31].

5.2 Dynamische Zustände

5.2.1 Spannungsabhängiger $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux

Eine detaillierte Analyse des spannungsabhängigen $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux und seiner Funktion für den Ionenhaushalt von Acetabularia wurde bereits in einer früheren Arbeit [30] an lichtinduzierten Aktionspotentialen vorgestellt. Dieser Abschnitt soll zeigen, daß hauptsächlich die Membranspannung den $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux beeinflußt und weniger das Lichtprogramm.

5.2.1.1 $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe lichtinduzierter Änderungen des Membranpotentials

Membrandepolarisierungen lassen sich bei Acetabularia nach vorhergehender Belichtung mit einem "Licht aus"-Reiz auslösen. Abb. 24 zeigt zwei mögliche Reaktionen einer Acetabularia-Zelle auf "Licht aus". Zusätzlich sind in der Abbildung die entsprechenden Änderungen des $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux dargestellt.

In einem Fall (Abb. 24 A) reagiert die Zelle mit einer vorübergehenden Membrandepolarisierung in der typischen Form eines Aktionspotentials (AP) [15]. Sinkt im Verlaufe des AP der Betrag der Membranspannung unter den Wert von $E_K \approx -90$ mV, so ist eine deutliche Steigerung des $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux zu verzeichnen. In diesem Beispiel erreicht der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux bei ca. -60 mV mit etwa 180 x 10^{-8} Mol $m^{-2}s^{-1}$

das 15-fache des Wertes bei RP = -180 mV ($I_{RP} \approx 12 \times 10^{-8}$ Mol $K^+ m^{-2} s^{-1}$), während der Betrag der Membranspannung im Verlaufe des AP nur maximal um den Faktor 3 kleiner geworden ist. Im Verlaufe der Repolarisierung nimmt der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux wieder ab und erreicht bei RP wieder den Ausgangswert vor dem AP (ca. 12×10^{-8} Mol $m^{-2} s^{-1}$).

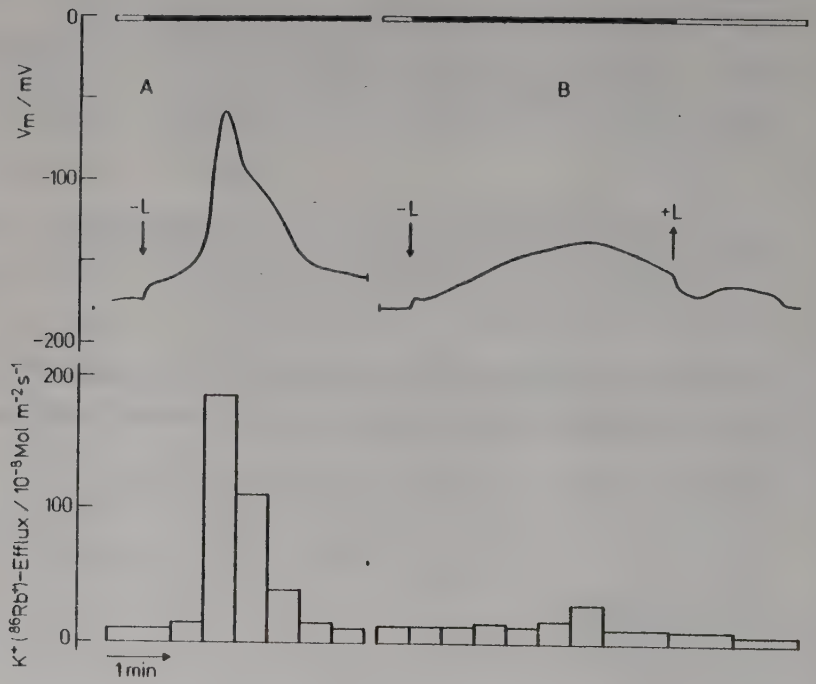


Abb. 24 : $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe lichtinduzierter Änderungen der Membranspannung V_m.
A: "Licht aus", Aktionspotential
B: "Licht aus", kein Aktionspotential
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; + L = "Licht an
- L = "Licht aus"

Diese Beziehung zwischen $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux und der Membranspannung V_m läßt sich durch eine Fluß/Spannungskurve charakterisieren, die für Membranspannungen positiver E_K entsprechend den unterschiedlichen K^+- Konzentrationen innen und außen, $[K^+]_i$ = 400 mM und $[K^+]_o$ = 10 mM, eine ca. 40-fach erhöhte Leitfähigkeit für den K^+- Ausstrom zeigt [30].

Löst ein "Licht aus"- Reiz kein AP aus, so kommt es im typischen Falle zu einer Membrandepolarisierung, wie sie in Abb. 24 B dargestellt ist. Während in diesem Beispiel die Membranspannung vorübergehend von -180 mV auf -140 mV absinkt, wird der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux um den Faktor 2 auf maximal 28 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ gesteigert und geht im Verlaufe der Repolarisierung wieder auf den Ausgangswert zurück. Die drastische Effluxsteigerung, die im Verlauf des AP zu beobachten war, bleibt in diesem Falle aus. Dies ist bereits ein Hinweis darauf, daß der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Wesentlichen stark spannungsabhängig und kaum lichtabhängig ist.

5.2.1.2 "Feinstruktur" des $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe eines Aktionspotentials

Abb. 25 zeigt noch einmal ein mit "Licht aus" ausgelöstes AP, Darunter ist die "Feinstruktur" der $K^+(^{86}Rb^+)$-Effluxänderungen zunächst in 15 s - Intervallen aufgetragen. Deutlich ist zu erkennen, daß der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux erst dann drastisch ansteigt, wenn die Membranspannung positiver

als E_K wird. Ausgehend von ca. 15 x 10^{-8}Mol $K^+m^{-2}s^{-1}$ bei RP,steigt der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux auf ca. 70 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ bei -80 mV. Die $K^+(^{86}Rb^+)$-Effluxsteigerung ist in diesem Falle nicht so groß wie in dem Beispiel aus Abb. 24 A,

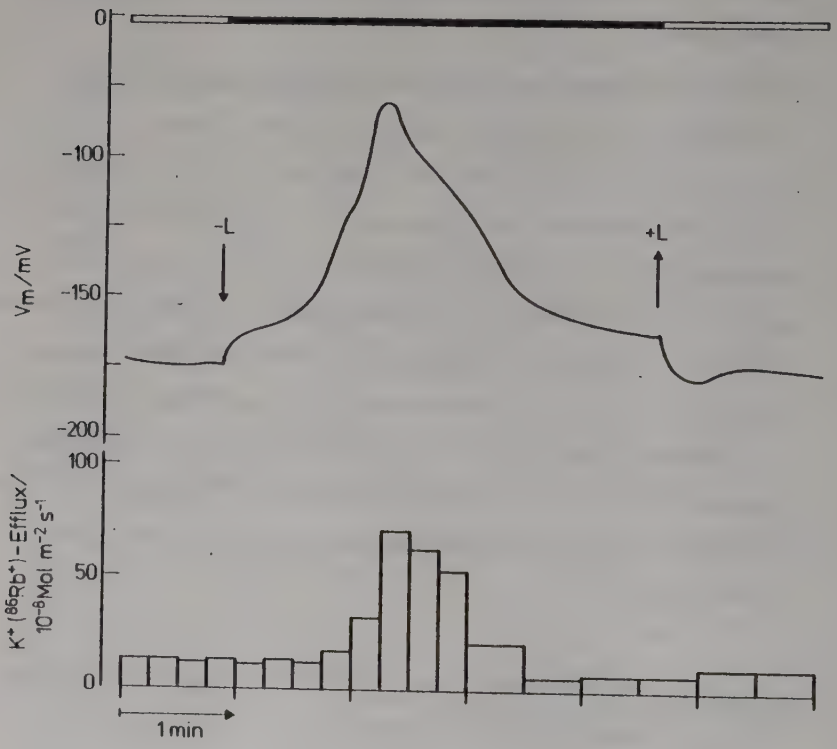


Abb. 25 : $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe eines lichtinduzierten Aktionspotentials; "Feinstruktur".
V_m = Membranspannung/mV; Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; + L = "Licht an", - L = "Licht aus".

da die Membranspannung während des in Abb. 25 dargestellten AP E_K nicht wesentlich überschreitet.

Außerdem zeigt das Beispiel in Abb. 25, daß der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux bei RP_{Licht} ($\approx$ -180 mV) um bis zu 20% höher liegen kann als bei RP_{Dunkel} ($\approx$ -170 mV). Hierbei handelt es sich nun offenbar um einen Lichteffekt, da der erhöhte $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Licht nicht der Fluß/Spannungskennlinie folgt.

5.2.1.3 $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe spontaner und strominduzierter Änderungen der Membranspannung

Wie Abb. 26 eindeutig bestätigt, handelt es sich bei den $K^+(^{86}Rb^+)$-Effluxsteigerungen im Verlaufe von Membrandepolarisierungen tatsächlich um spannungsabhängige Effluxänderungen, die keine direkte Folge des Lichtprogramms sind.

Zunächst zeigt Abb. 26 A ein spontanes AP im Licht und danach 2 mit depolarisierenden Strompulsen (10 µA, 15 s) ausgelöste APe (Abb. 26 B,C), sowie eine strominduzierte Membrandepolarisierung, die nicht zu einer Erregung der Membran in der Form eines APs führte (Abb. 26 D).

Es ist deutlich zu erkennen, daß der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux auch bei konstanter Beleuchtung (ca. 80 W m^{-2}) stark spannungsabhängig ist. Im Verlaufe des spontanen APs (Abb. 26 A) steigt der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux bis auf maximal 300 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Während der beiden strominduzierten

APe steigt dagegen der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux maximal nur auf ca. 230 bzw. 180 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Betrachtet man jedoch die Integrale der Membranspannungen positiver E_K über die Zeit, so verhalten sich diese für die 3 APe in Abb. 26 A-C wie 1:0,7:0,6, während sich die im gleichen Zeitraum abgegebenen $K^+(^{86}Rb^+)$-Mengen wie 1:0,6:0,5 verhalten. Dies zeigt, im Rahmen der Meßgenauigkeit, deutlich die Abhängigkeit des $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux von der Dauer und dem Betrag der Membrandepolarisierung.

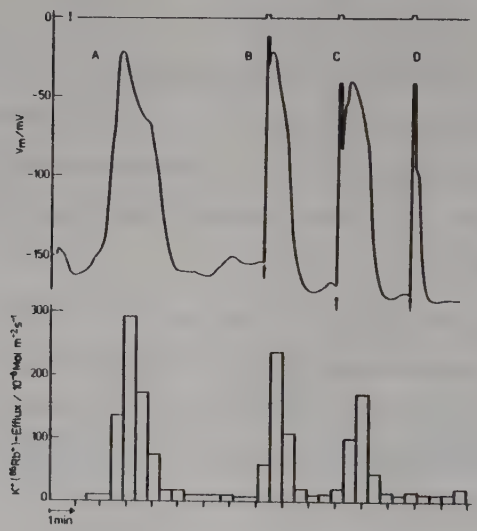


Abb. 26 : $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux im Verlaufe von einer spontanen Änderung der Membranspannung V_m (A) und 3 strominduzierten Änderungen der Membranspannung (B - D).
A: spontanes Aktionspotential im Licht
B - C: strominduzierte Aktionspotentiale
D: strominduzierte Depolarisierung ohne anschließenden Erregungsvorgang
I = depolarisierender Strom (10 µA, 15 s); Licht: ca. 80 W m^{-2}

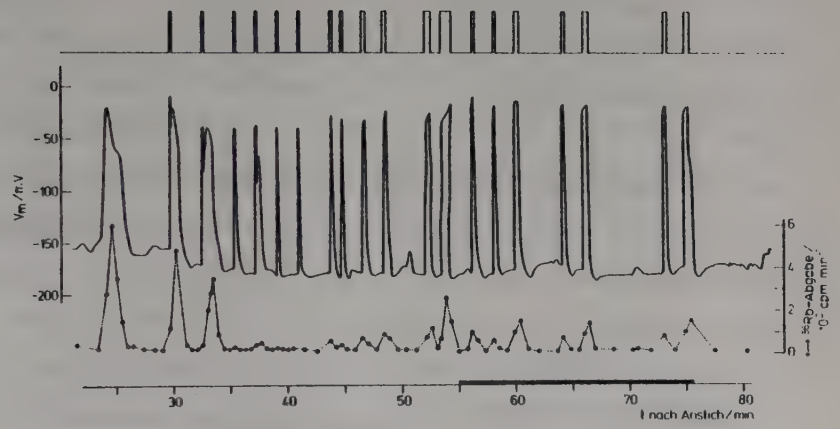


Abb. 27 : Protokoll eines $K^+(^{86}Rb^+)$-Effluxexperimentes mit simultaner Messung von Membranspannung V_m und $^{86}Rb^+$-Radioaktivitätsabgabe.
Membranspannung variiert durch Lichtprogramm (Licht: ca. 80 W m^{-2} schwarzer Balken = Dunkel) und depolarisierende Strompulse (I = 10 µA, Dauer 15 - 60 s); Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min

Das Protokoll eines $K^+(^{86}Rb^+)$-Effluxexperimentes mit simultaner Messung der Membranspannung (Abb. 27) bestätigt diesen Befund. Erreicht die Membranspannung spontan oder durch depolarisierende Strompulse Werte, die positiver als E_K sind, so steigt der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux stark an. Dabei ist die Menge des abgegebenen $K^+(^{86}Rb^+)$ deutlich abhängig vom Betrag und von der Dauer der Depolarisierung (vgl. Abb. 27, Depolarisierungen und $^{86}Rb^+$-Abgabe zwischen t = 43 min und t = 55 min)

5.2.2 $^{22}Na^{+}$-Efflux mit simultaner Messung der Membranspannung

5.2.2.1 Normalzellen

Wie die Abbildungen 28 und 29 verdeutlichen, können im Verlaufe von spontanen (Abb. 28 A) oder mit Lichtprogramm ausgelösten APen (Abb. 28 B; Abb. 29) $^{22}Na^{+}$-Effluxsteigerungen auftreten (v.a. am Anfang der Experimente, bis ca. 40 min nach Anstich). Diese Effluxsteigerungen sind aber

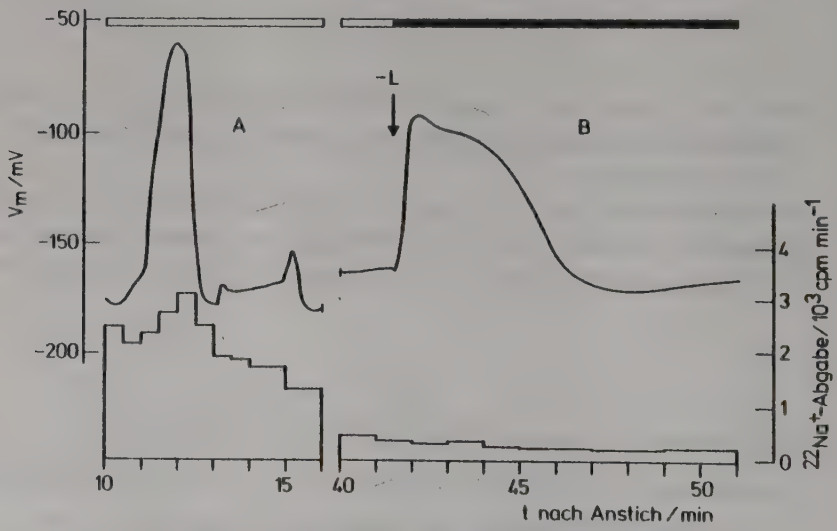


Abb. 28 : $^{22}Na^{+}$-Abgabe im Verlaufe eines spontanen (A) und eines lichtinduzierten Aktionspotentials (B). V_m = Membranspannung/mV; Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min).

nicht streng mit der Membranspannung korreliert. Während nämlich im Verlaufe eines Aktionspotentials in jedem Falle ein Anstieg des $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux beobachtet wurde, können solche Abgabesteigerungen im Falle von $^{22}Na^+$ auch ausbleiben (Abb. 28 B; Abb. 29, 52 min nach Anstich). Dieses Phänomen tritt in ähnlicher Form auch beim $^{36}Cl^-$-Efflux auf (vgl. 5.2.3.1).

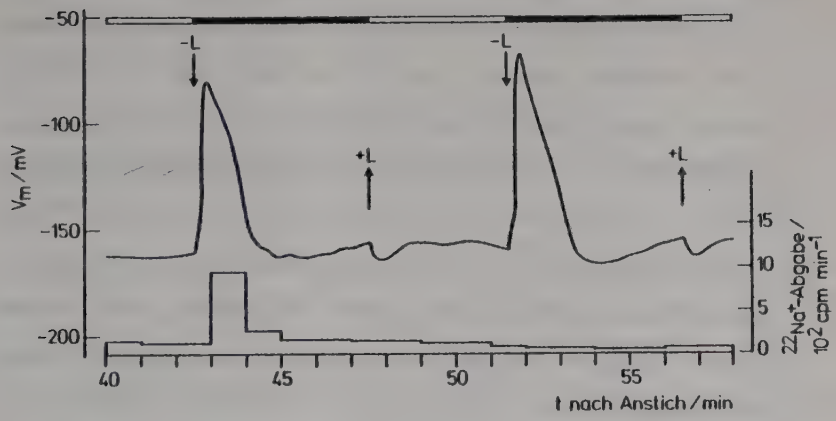


Abb. 29 : $^{22}Na^+$-Abgabe im Verlaufe von lichtinduzierten Änderungen der Membranspannung V_m.
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel
+L = "Licht an", -L = "Licht aus"
Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min)

Im Verlaufe des spontanen APs in Abb. 28 A wird die einem Na^+-Efflux bei RP (-180 mV) von 620 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ entsprechende $^{22}Na^+$-Abgabe um den Faktor 1,5, entsprechend einem Na^+-Efflux von 930 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$, bei -60 mV gesteigert. Abb. 29 zeigt ein Aktionspotential, daß 43 min nach Versuchsbeginn ausgelöst wurde und in dessen Verlauf die Zellmembran bis -80 mV depolarisiert wird. Im Verlaufe dieses APs wird die $^{22}Na^+$-Abgabe ebenfalls deutlich gesteigert.

Da für den $^{22}Na^+$-Efflux eine 2-phasige Efflux-Kinetik nachgewiesen wurde (5.1.2.3), ist diese Abgabesteigerung nicht ohne Weiteres in einen Efflux-Wert umzurechnen. Zunächst muß einmal betrachtet werden, welcher Fluß-komponente, K-2 oder K-3, diese Abgabesteigerung zuzuordnen ist.

Zu diesem Zeitpunkt des Versuches (43 min nach Versuchs-beginn) hat die Komponente 2 des $^{22}Na^+$-Efflux (in diesem Beispiel τ_2= 14 min) noch etwa 5% der Anfangsradioaktivität, gegenüber ca. 83% in K-3 (τ_3= 4 h). Handelt es sich um eine Abgabesteigerung aus K-2, so entspricht die abgegebene Radioaktivität zu diesem Zeitpunkt einem Efflux von 3260 x 10^{-8}Mol $Na^+m^{-2}s^{-1}$ und liegt damit im Bereich der Werte, die für den Cl^--Efflux im Verlaufe von APen gefunden werden (5.2.3.1). Das würde allerdings bedeuten, daß die Zelle innerhalb des Meßintervalls von 1 min ca. 67% ihres gesamten Na^+-Gehaltes abgibt oder zumindest austauscht.

Handelt es sich dagegen um eine Abgabesteigerung aus K-3, resultiert während des Meßintervalls ein mittlerer Efflux von 151 x 10^{-8}Mol $Na^+m^{-2}s^{-1}$. Das entspricht einer 7-fachen Steigerung des Efflux aus K-3, der in diesem Beispiel 22 x 10^{-8}Mol $Na^+m^{-2}s^{-1}$ beträgt (bei RP = -180 mV).

Während eines kürzeren Zeitintervalls hätte auch ein noch größerer Na^+-Efflux stattfinden können, sodaß der gesteigerte Na^+-Efflux in diesem Beispiel durchaus mit der Effluxsteigerung der Zelle aus Abb. 28 A (310 x 10^{-8}Mol $Na^+m^{-2}s^{-1}$ während 0,5 min) zu vergleichen ist. Damit liegt es nahe, diese Steigerungen des Na^+-Efflux der Flußkomponente 3 zuzuordnen.

Läßt sich für den $^{22}Na^+$-Efflux auch keine eindeutige Spannungsabhängigkeit nachweisen, so scheint doch Licht den $^{22}Na^+$-Efflux zu stimulieren. In Abb. 28 B und Abb. 29 zeigt sich ein leichter Rückgang des $^{22}Na^+$-Efflux im Dunkel. Nach "Licht aus" kann der $^{22}Na^+$-Efflux vorübergehend auf ca. 60% des Wertes bei RP im Licht sinken, jedoch nach einiger Zeit (5 - 10 min) bei RP_{Dunkel} ($\approx$ -170 mV) wieder 80 - 95% des Wertes bei RP_{Licht} (ca. -180 mV) erreichen.

Diese lichtabhängigen Änderungen des $^{22}Na^+$-Efflux können von Zelle zu Zelle sehr unterschiedlich ausgeprägt sein und lassen im Mittel allenfalls eine leichte Reduktion des $^{22}Na^+$-Efflux im Dunkel erkennen, die gegenüber dem Efflux bei Licht statistisch nicht gesichert ist.

5.2.2.2 Nicht - vakuolisierte Zell-"Stummel"

Ebenso wie bei den Normalzellen (5.2.2.1), wurde auch bei den Zell-"Stummeln" kein spannungsabhängiger $^{22}Na^{+}$-Efflux beobachtet. Das Beispiel in Abb. 30 zeigt im Prinzip das gleiche Bild wie bei den Normalzellen. Bemerkenswert ist allerdings, daß Licht in einigen Fällen (Abb. 30, 20 - 25 min nach Anstich, 35 min nach Anstich) den $^{22}Na^{+}$-Efflux vorübergehend zu hemmen scheint, doch ist dieser Effekt wiederum statistisch nicht gesichert.

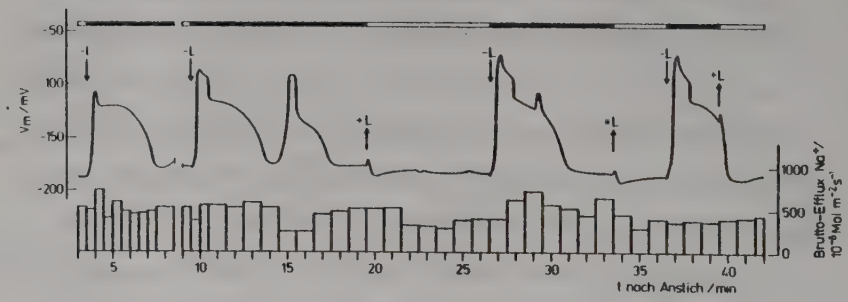


Abb. 30 : Zell-"Stummel"; $^{22}Na^{+}$-Efflux im Verlaufe spontaner und lichtinduzierter Änderungen der Membranspannung V_m.
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an" -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min).

5.2.3 $^{36}Cl^-$- Efflux mit simultaner Messung der Membranspannung

5.2.3.1 Normalzellen; Phänomene

Abb. 31 zeigt den Verlauf der $^{36}Cl^-$- Abgabe während eines spontanen Aktionspotentials im Dunkel (Abb. 31 A), nach "Licht an" (Abb. 31 B) und während eines mit "Licht aus" ausgelösten APs (Abb. 31 C).

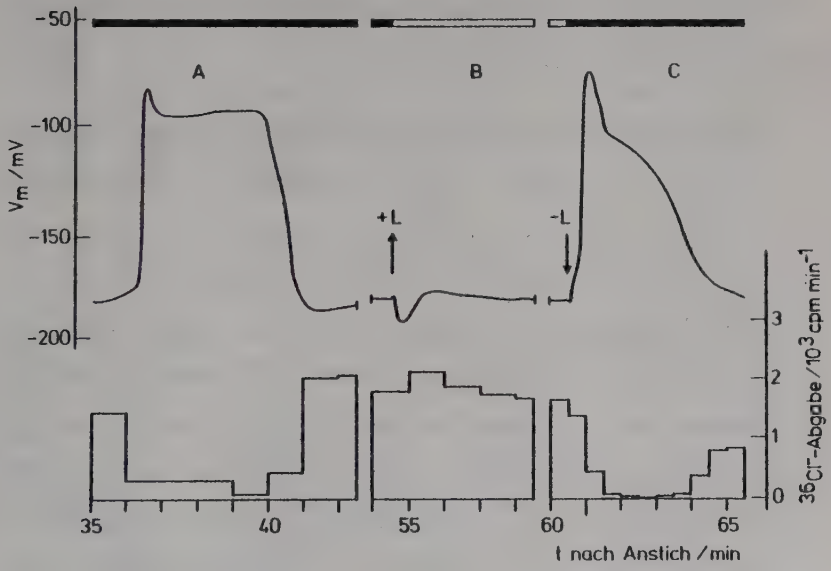


Abb. 31 : $^{36}Cl^-$- Abgabe im Verlaufe spontaner (A) und lichtinduzierter (B, C) Änderungen der Membranspannung V_m. Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an", -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min).

Ausgehend von ihrem Wert bei RP wird die $^{36}Cl^-$- Abgabe mit sinkendem Betrag der Membranspannung drastisch (Abb.31,A,C reduziert. Entsprechend steigt die $^{36}Cl^-$- Abgabe während der Repolarisierung auf RP wieder an. Eine Hyperpolarisierung der Membran über RP hinaus, hat eine weitere $^{36}Cl^-$- Abgabesteigerung zur Folge (Abb. 31 B, erhöhte $^{36}Cl^-$- Abgabe während der Hyperpolarisierung nach "Licht an").

Die $^{36}Cl^-$-Abgabe im Licht ist ebenso spannungsabhängig. Abb. 32 zeigt die $^{36}Cl^-$- Abgabe im Verlaufe von Membrandepolarisierungen, die mit depolarisierenden Strompulsen (I = 10 µA, 10 - 30 s) ohne Änderung des Lichtprogramms ausgelöst wurden.

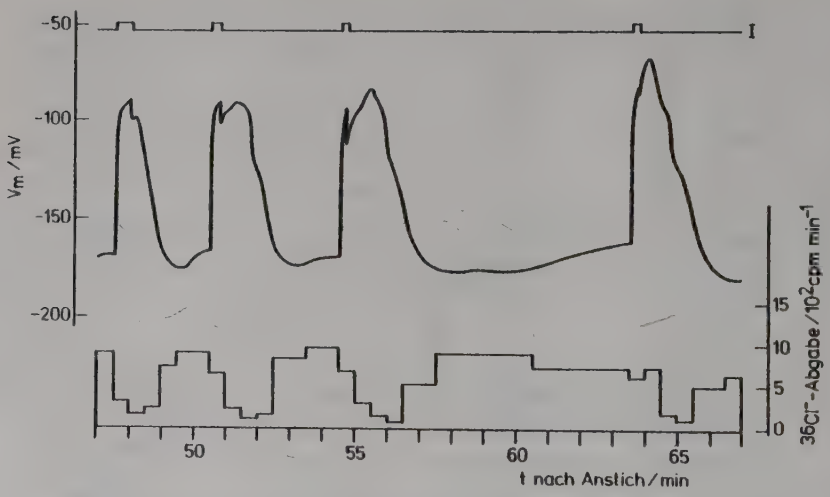


Abb. 32 : $^{36}Cl^-$- Abgabe im Verlaufe strominduzierter Änderungen der Membranspannung V_m, ohne Änderung des Lichtprogramms.
Licht: ca. 80 W m^{-2}; I = 10 µA dep.; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min).

Ausgehend von RP (in diesem Beispiel ca. -170 mV) wird im Verlaufe der Depolarisierungen auch im Licht die $^{36}Cl^-$- Abgabe vorübergehend stark reduziert (bis ca. 7 - 17% des Wertes bei RP). Mit der Repolarisierung der Membran auf RP erreicht auch die $^{36}Cl^-$- Abgabe wieder ungefähr den Ausgangswert vor Beginn der Depolarisierung.

Bemerkenswert ist, daß in dem Beispiel in Abb. 32 mit zunehmender Dauer und zunehmendem Betrag der Depolarisierungen die Abnahme der Cl^-- Abgabe anscheinend langsamer erfolgt, sodaß der starken Abnahme der $^{36}Cl^-$- Abgabe bei niedrigen Membranspannungen eine gewisse Steigerung überlagert erscheint. Besonders deutlich wird diese Überlagerung der $^{36}Cl^-$- Abgabe am Beispiel der letzten strominduzierten Depolarisierung in Abb. 32 (63,5 min nach Anstich), die das AP mit der größten Amplitude auslöst.

Der depolarisierende Strompuls und die anschließende Depolarisierung im Verlaufe des AP führen dabei zunächst zu einer Senkung der $^{36}Cl^-$- Abgabe. Im Verlaufe des APs wird die Membran bis auf ca. -60 mV depolarisiert. Gleichzeitig ist nun die $^{36}Cl^-$- Abgabe innerhalb eines Meßintervalls von 0,5 min gesteigert, um nach der Repolarisierung der Membran auf Werte, die negativer als ca. -100 mV sind, wieder deutlich die oben dargestellte spannungsabhängige Reduktion der $^{36}Cl^-$- Abgabe zu zeigen.

Die vorübergehende $^{36}Cl^-$- Abgabesteigerung während des APs entspricht in diesem Beispiel einer Überlagerung des spannungsabhängig reduzierten Cl^-- Efflux mit einem Cl^-- Efflux von 100 - 150 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Dieser Wert ent-

spricht nun den Werten von 100 - 300 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$, die für einen gesteigerten K^+($^{86}Rb^+$)-Efflux bei Membranspannungen zwischen -60 und -40 mV gefunden werden (vgl.5.2.1).

Damit kann die Cl^-- Effluxsteigerung bei Membranspannungen, die negativer als etwa -100 mV sind, in enger Korrelation mit der Spannungsabhängigkeit des K^+-Efflux gesehen werden. Dieser Punkt wird auf der Grundlage der Fluß/Spannungs-kennlinien für Cl^- und K^+ unter 6.3 ausführlich diskutiert.

Im Verlaufe von APen treten von Zeit zu Zeit, v.a. jedoch am Anfang der Effluxexperimente, $^{36}Cl^-$- Abgabesteigerungen auf, die bis zu 6000 x 10^{-8}Mol $Cl^-m^{-2}s^{-1}$ erreichen können. Beispiele finden sich in Abb. 33, 117 min und 132 min nach Anstich, wo der $^{36}Cl^-$-Efflux auf maximal 5400 x 10^{-8} Mol $m^{-2}s^{-1}$ ansteigt.

Dieser vorübergehende und, verglichen mit dem Efflux der Ionen K^+ und Na^+, extrem hohe Cl^--Efflux ist aber nicht streng mit der Membranspannung korreliert, wie das etwa bei K^+($^{86}Rb^+$) der Fall ist. So treten diese Cl^-- "Ausbrüche" zwar bevorzugt im Verlaufe von APen auf, aber sie können in Bezug auf das Spannungsminimum der Depolarisierung 0,5 - 1 min verzögert sein oder ganz ausbleiben (vgl. Abb. 33).

Vor allem am Anfang eines Auswaschexperimentes mit simultaner Messung der Membranspannung treten gelegentlich (ca. 10% der Beobachtungen) im Verlaufe oder in der Folge von APen bis zu 3 solcher Cl^-- "Ausbrüche" im Abstand von 0,5 - 1,5 min hintereinander auf. Dabei kann die Membran-

spannung bereits in der Repolarisierungsphase sein oder RP bereits erreicht haben.

Außerdem können diese vorübergehenden Cl^--Effluxsteigerungen (Dauer meist $\leq$ 0,5 min) auch bei RP auftreten, ohne daß eine Änderung der Membranspannung zu beobachten ist.

Diese Befunde sprechen gegen eine direkte Spannungsabhängigkeit der drastischen Cl^--Effluxsteigerungen.

Abb. 33 zeigt die möglichen Reaktionen des $^{36}Cl^-$-Efflux auf Membrandepolarisierungen in Form von APen. Im Verlaufe der beiden ersten APe (117 min bzw. 132 min nach Anstich) erreicht der Cl^-- Efflux innerhalb eines Meßintervalls Werte von maximal 5400 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Das entspricht jeweils der Abgabe von ca. 4% des gesamten Cl^--Gehaltes der Zelle.

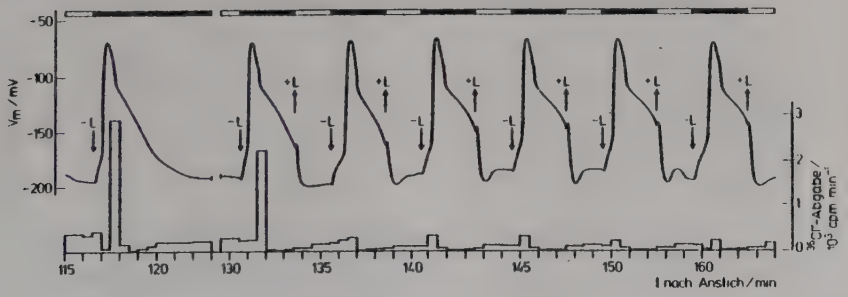


Abb. 33 : $^{36}Cl^-$- Abgabe; unterschiedliche Reaktionen auf lichtinduzierte Änderungen der Membranspannung V_m - $^{36}Cl^-$- "Ausbrüche" und spannungsabhängig reduzierte $^{36}Cl^-$-Abgabe im Verlaufe von Aktionspotentialen.
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an", -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min).

Während der folgenden 5 APe bleiben die drastischen $^{36}Cl^-$- "Ausbrüche" aus, und es sind neben der spannungsabhängigen Reduktion der $^{36}Cl^-$- Abgabe (s.o.) nur geringe Abgabesteigerungen zu beobachten. Diese Abgabesteigerungen ergeben ein Cl^--Efflux von 300 - 400 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ und entsprechen wiederum dem gesteigerten $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux bei E_m negativer als E_K.

5.2.3.2 Nicht-vakuolisierte Zell-"Stummel"

Das Beispiel aus Abb. 34 zeigt die typischen Reaktionen des $^{36}Cl^-$-Efflux eines Acetabularia-Zell-"Stummels" auf lichtinduzierte Änderungen der Membranspannung (25 h nach der Zentrifugation).

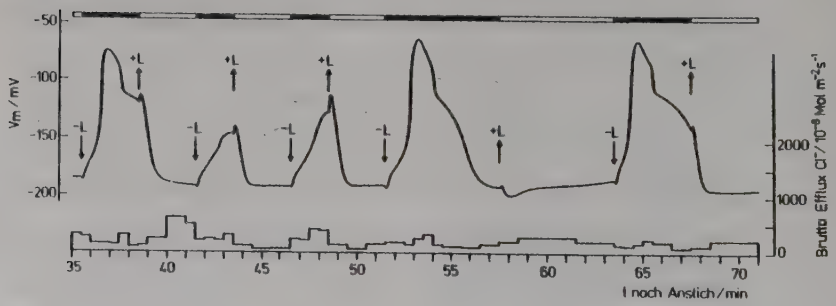


Abb. 34 : Zell-"Stummel"; $^{36}Cl^-$- Abgabe im Verlaufe lichtinduzierter Änderungen der Membranspannung V_m (25 h nach Zentrifugation)
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an" -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min).

Wie bei Normalzellen geht der $^{36}Cl^-$-Efflux bei STn im Verlaufe von APen zunächst zurück (Abb. 34, 36 min, 52 min und 64 min nach Anstich). Diesem spannungsabhängig reduzierten $^{36}Cl^-$-Efflux (bis ca. 30 - 50% des Efflux bei RP) ist auch bei den STn eine Efflux-Erhöhung bis ca. 300 x 10^{-8}Mol $Cl^- m^{-2} s^{-1}$ überlagert, wenn die Spannung im Verlaufe des APs positiver als etwa -100 mV wird.

Demnach zeigt der $^{36}Cl^-$-Efflux der ST prinzipiell die gleiche Spannungsabhängigkeit wie der $^{36}Cl^-$- Efflux der NZ, wenngleich die Reduktion des $^{36}Cl^-$-Efflux mit sinkendem Betrag der Membranspannung bei den STn nicht so ausgeprägt ist (vgl. die quantitative Behandlung 5.2.3.4 und 5.2.3.5).

Das Effluxexperiment, dessen Ergebnisse in Abb. 35 dargestellt sind, wurde 23 h nach Beginn der Inkubation mit $^{36}Cl^-$ und 24 h nach der Zentrifugation durchgeführt.

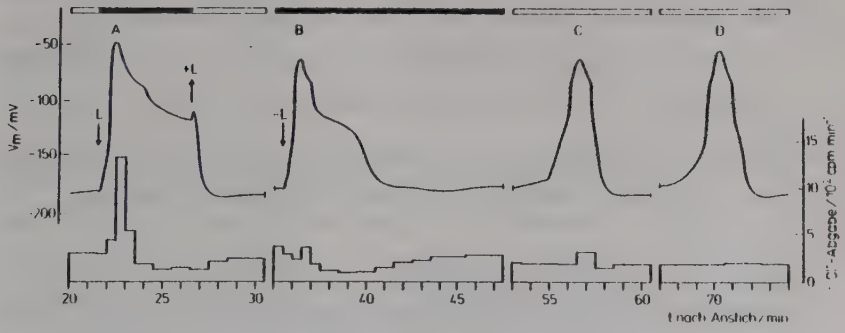


Abb. 35 : Zell-"Stummel"; $^{36}Cl^-$- Abgabe im Verlaufe von lichtinduzierten (A,B) und spontanen (C,D) Änderungen der Membranspannung V_m (24 h nach Zentrifugation) A,B: lichtinduziertes Aktionspotential; C,D: spontanes Aktionspotential. Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an", -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit

Die $^{36}Cl^-$- Abgabe bei RP entspricht in diesem Beispiel einem Cl^--Efflux von ca. 340 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Damit ergibt sich für die um den Faktor 6 gesteigerte $^{36}Cl^-$-Abgabe, die 23 min nach Anstich zu verzeichnen ist, in dem Meßintervall von 0,5 min ein mittlerer Cl^--Efflux von etwa 2000 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Zu einem späteren Zeitpunkt des Experimentes (36 min nach Anstich) läuft ein ebenfalls lichtinduziertes AP ab, in dessen Verlauf keine vergleichbare $^{36}Cl^-$-Abgabesteigerung mehr zu beobachten ist. Auch die noch später auftretenden spontanen APe (55 min und 70 min nach Anstich) haben keine drastisch gesteigerte $^{36}Cl^-$-Abgabe zur Folge, sondern zeigen lediglich die spannungsabhängige Reduktion der $^{36}Cl^-$-Abgabe bei Membranspannungen positiver als ca. -100 mV (s.o.).

Dagegen zeigt Abb. 36 zwei APe, die 23 min, bzw. 51 min nach Anstich ablaufen (Abb. 36 A: spontanes AP im Licht; Abb. 36 B: lichtinduziertes AP). Im Verlaufe des ersten APs(Abb. 36 A) steigt die $^{36}Cl^-$- Abgabe - nachdem sie zunächst die spannungsabhängige Abnahme zeigt - auf Werte, die einem Cl^--Efflux bis zu 4000 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ entsprechen. Dieser Wert ist vergleichbar mit dem gesteigerten Efflux aus dem Beispiel in Abb. 35 A (AP 23 min nach Anstich).

Im Verlaufe des zweiten APs (Abb. 36 B, 51 min nach Anstich) wird die $^{36}Cl^-$-Abgabe wiederum drastisch gesteigert. Sie entspricht in diesem Falle einem Cl^--Efflux von ca. 3000 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Diese Effluxsteigerungen lassen sich durchaus mit den Cl^--"Ausbrüchen" der NZ vergleichen

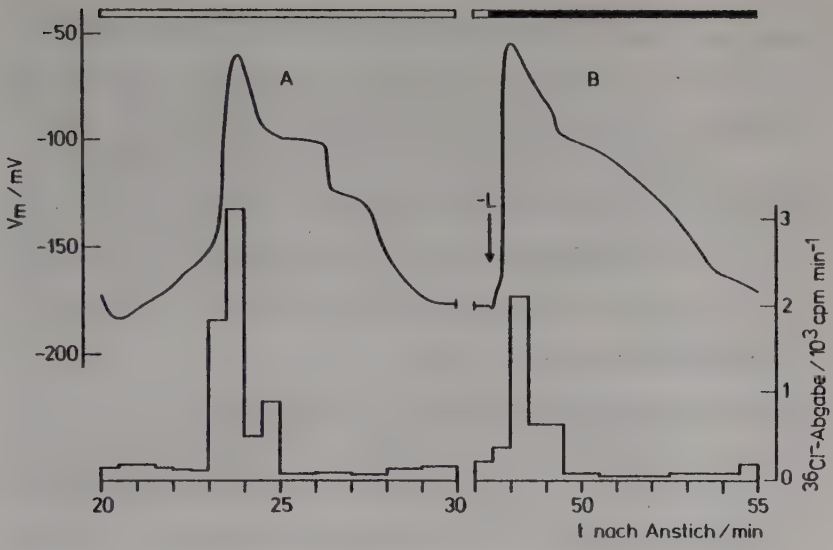


Abb. 36 : Zell-"Stummel"; $^{36}Cl^-$-Abgabe im Verlauf spontaner (A) und lichtinduzierter (B) Änderungen der Membranspannung V_m (7 Tage nach Zentrifugation)
A: spontanes Aktionspotential im Licht; B: lichtinduziertes Aktionspotential.
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; -L ="Licht aus"
Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min)

(5.2.3.1). Interessanterweise wurde das Experiment aus Abb. 36, in dessen Verlauf der Zell-"Stummel" auch 53 min nach Anstich noch diese Cl^--"Ausbrüche" zeigt, erst 7 Tage nach der Zentrifugation durchgeführt, während die beiden Experimente aus Abb. 34 und Abb. 35, wie oben erwähnt, bereits einen Tag nach der Zentrifugation stattfanden.

Das legt die Vermutung nahe, daß sich die ST nach der Zentrifugation wieder rekonstituieren und ihr Flußverhalten, zumindest was den Cl^--Efflux betrifft, im Laufe der Zeit wieder dem der NZ angleichen. Da in STn wenige Tage nach der Zentrifugation wieder kleine Vakuolen nachzuweisen sind (vgl. 3.8), besteht der Verdacht, daß diese Cl^--"Ausbrüche" in irgendeiner Weise mit dem Vorhandensein von Vakuolen oder Vesikeln zusammenhängen.

Aus den Ergebnissen, wie sie die Abbildungen 34, 35 und 36 zeigen, wird deutlich, daß auch bei STn der Cl^--Efflux stark von der Membranspannung und nicht so sehr direkt vom Licht abhängt, genau wie bei den NZn (vgl. 5.2.3.1).

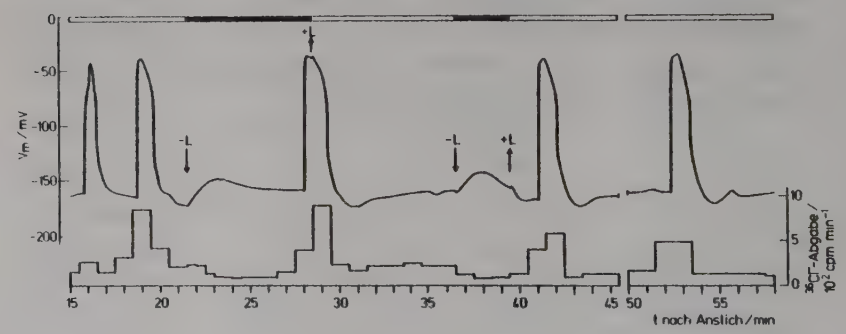


Abb. 37 : Zell-"Schlauch"; $^{36}Cl^-$-Abgabe im Verlaufe von spontanen und lichtinduzierten Änderungen der Membranspannung V_m (23 h nach Zentrifugation)
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an" -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min).

5.2.3.3. Cytoplasmafreie Zell-"Schläuche"

Die zu Messungen herangezogenen "Schläuche" (Slle) waren stets sehr turgeszent, und es gelang nur in 2 Fällen, einwandfreie elektrophysiologische Messungen durchzuführen. Meist platzten die Membranen der Slle beim Einstich der Meßelektrode oder kurz danach.

Die spannungsabhängige $^{36}Cl^-$- Abgabe eines Acetabularia-"Schlauches", 23 h nach der Zentrifugation, ist in Abb. 37 dargestellt. Die $^{36}Cl^-$- Abgabesteigerungen vor und während der spontanen Membrandepolarisierungen (16, 19, 23, 41 und 52 min nach Anstich)lassen sich nicht als spannungsabhängige $^{36}Cl^-$- Abgabesteigerungen deuten. Wie aus Abb. 37 deutlich hervorgeht, steigt, im Gegensatz zu den Befunden bei spontanen APen, vor jeder dieser Depolarisierungen zunächst die $^{36}Cl^-$- Abgabe, bevor die Membranspannung innerhalb von 1 - 2 s von ca.-160 mV auf -50 bis -40 mV zusammenbricht. Die Repolarisierung der Membran gleicht in diesem Falle etwa der Repolarisierungsphase eines APs.

Diese Zusammenbrüche der Membranspannung sind wahrscheinlich auf Undichtigkeiten der Zellmembran an der Meßelektrode zurückzuführen. Infolge des hohen Turgors werden vorübergehend unspezifisch Ionen an dieser Leckstelle abgegeben, wobei es zu einem Kurzschluß an dieser Stelle der Membran kommen kann, bis die Membran die Elektrode wieder dicht umschließt.

Mit "Licht aus" ausgelöste Depolarisierungen um jeweils

ca. 20 mV (Abb. 37, 22 und 37 min nach Anstich) lassen dagegen die $^{36}Cl^-$- Abgabe offensichtlich spannungsabhängig auf etwa 50% des Wertes bei RP (bei SHen ≈ -160 mV) absinken.

Abb. 38 zeigt die Ergebnisse eines Effluxexperimentes mit simultaner Messung der Membranspannung, das 7 Tage nach der Zentrifugation durchgeführt wurde.

In diesem Falle ließen sich lichtinduziert APe auslösen. (Abb. 38, 41 und 66 min nach Anstich), in deren Verlauf der $^{36}Cl^-$-Efflux, wie bei NZn und STn, zunächst spannungsabhängig reduziert ist und bei E_m positiver als ca. -100 mV ebenfalls von einem gesteigerten $^{36}Cl^-$-Efflux überlagert wird.

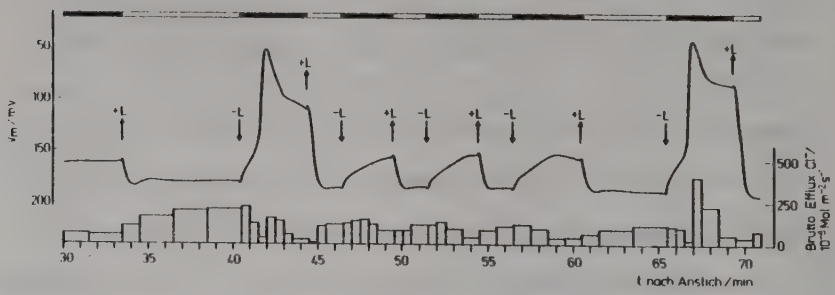


Abb. 38 : Zell-"Schlauch"; $^{36}Cl^-$-Efflux im Verlaufe von lichtinduzierten Änderungen der Membranspannung V_m
(7 Tage nach Zentrifugation)
Licht: ca. 80 W m^{-2}, schwarzer Balken = Dunkel; +L = "Licht an" -L = "Licht aus"; Abszisse: Zeit nach Anstich (t/min)

Während der lichtinduzierten Depolarisierungenn die nicht zu APen führten (Abb. 38, 46,5, 51,5 und 56,5 min nach Anstich) wird der Cl^--Efflux ebenfalls reduziert.

Auch die Zell-"Schläuche" von Acetabularia zeigen also variable Cl^--Flüsse, die wahrscheinlich vergleichbar spannungsabhängig sind wie die von NZn und STn, wobei sich die Beziehung zwischen Cl^--Efflux und Membranspannung mit zunehmendem zeitlichen Abstand von der Zentrifugation immer mehr den Verhältnissen der NZen angleicht.

5.2.3.4 Quantitative Beziehungen zwischen $^{36}Cl^-$- Efflux und Membranspannung; Normalzellen

Um die Spannungsabhängigkeit des Cl^--Efflux quantitativ erfassen zu können, wurde der Efflux bei verschiedenen Membranspannungen aus dem Verlauf nicht lichtinduzierter Spannungsänderungen (z.B. spontane APe) nach einer früher [30] dargestellten Methode bestimmt. Die Ergebnisse sind in Abb. 39 in der Form von Fluß(Efflux)/Spannungs-Diagrammen zusammengefaßt. Die drastischen Cl^--"Ausbrüche", die man häufig, aber nicht immer im Verlauf der APe beobachtet sind, wie bereits ausgeführt, nicht streng spannungsabhängig. Daher wurden diese Cl^--"Ausbrüche" zur Erfassung des Zusammenhanges zwischen Cl^--Efflux und Membranspannung nicht berücksichtigt.

Da die $^{36}Cl^-$-Efflux-Kinetik von Acetabularia bei NT 2-phasig ist, wurde zunächst die Spannungsabhängigkeit

des Cl^--Efflux am Anfang der Experimente (bis 20 min nach Beginn des Auswaschens) bestimmt, um so die Spannungsabhängigkeit des gesamten Cl^--Effluxsystems zu erfassen (Abb. 39 A, Punkte). Zusätzlich ist in Abb. 39 A (Kreise) die Beziehung zwischen Membranspannung und Cl^--Efflux für die langsame Effluxkomponente aufgetragen (aus Messungen ab t = 150 min nach Beginn des Auswaschens).

Von -160 mV bis -120 mV zeigt der Gesamt-Efflux eine spannungsabhängige Abnahme von $1,3 \times 10^{-4}$ Mol $Cl^- m^{-2} s^{-1} V^{-1}$, während der Cl^--Efflux der langsamen Komponente im selben Spannungsbereich mit ca. $0,4 \times 10^{-4}$ Mol $m^{-2} s^{-1} V^{-1}$ etwa um den Faktor 3 weniger spannungsempfindlich ist.

Für Spannungen, die positiver als etwa -100 mV sind, stimmt die Spannungsabhängigkeit des gesamten Systems mit der der langsamen Komponente ungefähr überein. In beiden Fällen erfolgt in diesem Spannungsbereich eine Effluxsteigerung von ca. 2×10^{-4} Mol $Cl^- m^{-2} s^{-1} V^{-1}$.

Das bedeutet, daß die Spannungsabhängigkeit des gesamten Effluxsystems sich nur bei Spannungen, die negativer als etwa -100 mV sind, wesentlich von der Spannungsabhängigkeit der langsamen Komponente unterscheidet. Durch Subtraktion der Fluß/Spannungs-Kurve der langsamen Komponente von der des Gesamt-Systems erhält man demnach die Spannungsabhängigkeit der schnellen Anfangskomponente wie sie in Abb. 39 B dargestellt ist.

Im Bereich von -160 mV bis -120 mV wird der Cl^--Efflux der schnellen Komponente um $1,1 \times 10^{-4}$ Mol $m^{-2} s^{-1} V^{-1}$

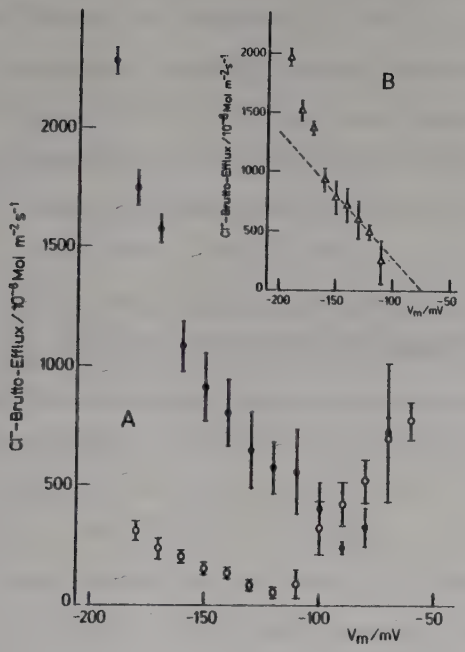


Abb. 39 : Cl^--Efflux/Membranspannungs-Charakterisik

A: Quantitativer Zusammenhang zwischen Membranspannung V_m/mV und Brutto-Cl^--Efflux/10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ für das gesamte Cl^-- Transportsystem (●) und für die langsame Komponente 3 der $^{36}Cl^-$- Auswaschkinetik (○) bei 21°C.

B: Spannungsabhängigkeit des Cl^--Efflux aus der schnellen Komponente 2 der $^{36}Cl^-$- Auswaschkinetik bei 21°C. Lineare Extrapolation der Cl^--Efflux-Abnahme zwischen -160 mV und -120 mV (unterbrochene Linie) ergibt $\Phi_2 = 0$ bei $V_m \approx -75$ mV $\approx E_D$.

Mittelwerte ± S.E.

reduziert. Extrapoliert man diese spannungsabhängige Abnahme des Cl^--Efflux linear, so wird bei einer Membranspannung von etwa -75 mV der Brutto-Cl^--Efflux aus der schnellen Komponente gleich Null (vgl. Abb. 39 B). Diese Membranspannung entspricht dem Diffusionspotential einer Acetabularia-Zelle [13], das als Ruhepotential gemessen wird, wenn die elektrogene Cl^--Pumpe nicht arbeitet (z.B. in der Kälte [13]). Liegt also kein Brutto-Efflux aus der schnellen Komponente vor, entspricht die Membranspannung dem Diffusionspotential.

Bemerkenswert ist weiterhin der nicht-lineare Anstieg des Cl^--Efflux der schnellen Komponente bei Membranspannungen, die negativer als ca. -160 mV sind (im untersuchten Bereich bis zu ca. 4×10^{-4} Mol $Cl^- m^{-2} s^{-1} V^{-1}$). Dieser auffällige Anstieg ist beim spannungsabhängigen Cl^--Efflux der langsamen Effluxkomponente nicht zu beobachten.

5.2.3.5 Quantitative Beziehungen zwischen $^{36}Cl^-$-Efflux und Membranspannung; "Stummel" und "Schläuche".

Das Fluß/Spannungsdiagramm in Abb. 40 zeigt den Zusammenhang zwischen Membranspannung und Cl^--Efflux bei STn (Abb. 40, Punkte) und SHn (Abb. 40, Kreise).

Dabei liegen im gesamten untersuchten Spannungsbereich die Cl^--Flüsse aus STn etwas höher als die aus SHn. Im Falle der ST nimmt der Cl^--Efflux im Spannungsbereich zwischen -180 mV und -110 mV nur langsam ab (0,06 x

10^{-4}Mol $m^{-2}s^{-1}V^{-1}$), verglichen mit den Daten von NZ. Der Efflux der SHe in diesem Spannungsbereich läßt keine eindeutige Spannungsabhängigkeit erkennen.

Wird die Membranspannung positiver als etwa -110 mV, so ist sowohl bei STn als auch bei SHn ein Cl^--Effluxanstieg zu verzeichnen, für den sich im Falle der ST 1,2 x 10^{-4}Mol $m^{-2}s^{-1}V^{-1}$ und im Falle der SHe 0,3 x 10^{-4}Mol $m^{-2}s^{-1}V^{-1}$ ergeben.

Damit liegt die Effluxsteigerung der ST für Spannungen positiver als -110 bis -100 mV mit 1,2 x 10^{-4}Mol $Cl^-m^{-2}s^{-1}V^{-1}$ im Bereich der entsprechenden Werte für NZ (2,0 x 10^{-4} Mol $Cl^-m^{-2}s^{-1}V^{-1}$).

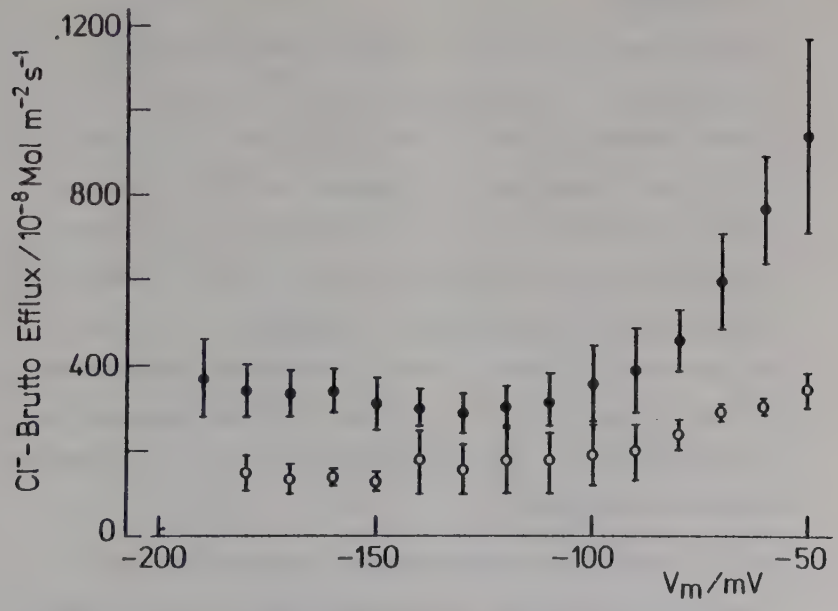


Abb. 40 : Cl^--Efflux/Membranspannungs-Charakteristik für "Stummel" (●) und "Schläuche" (○). Cl^--Brutto-Efflux in Abhängigkeit von der Membranspannung V_m ; Mittelwerte ± S.E.

5.2.4 Protonen-Efflux mit simultaner Messung der Membranspannung

Auf der Suche nach dem Gegenion für die großen, nicht-ladungstragenden Cl^-- Flüsse bei Acetabularia wurde der Protonen-Efflux (oder Influx von Äquivalenten) mit kontinuierlicher pH-Messung im Außenmedium (pH 6 - 9) verfolgt. Gleichzeitig wurde die Membranspannung registriert, ein Lichtprogramm geboten, oder das Membranpotential durch de- bzw. hyperpolarisierende Strompulse (10 µ A, 10 - 60 s) variiert. Die Meßanordnung (3.6.2.2) war in der Lage, Änderungen des H^+-Fluß von 1 - 2 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ zu erfassen.

Die Messungen gaben nur die photosynthesebedingten pH-Änderungen im Außenmedium wieder. Nach "Licht aus" findet, unabhängig davon, ob ein AP ausgelöst wurde oder nicht, eine Ansäuerung des Außenmediums statt. Dabei wurde ein maximaler Protonen-Efflux (oder Influx von Äquivalenten OH^- oder HCO_3^-) von 50 - 100 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ gemessen. Die Messungen geben aber keinerlei Hinweis auf spannungsabhängige Protonen-Flüsse bei Acetabularia. So konnte insbesondere im Verlaufe von strominduzierten Aktionspotentialen keine Änderung des externen pH-Wertes festgestellt werden.

Den lichtabhängigen pH-Änderungen sind bei Medien mit einem pH-Wert kleiner oder größer pH 8 pH-Driften überlagert. Dabei versucht die Alge,den pH ihres Außenmediums etwa auf 8 einzustellen.

Die dabei auftretenden Netto-Protonen-Flüsse liegen im Bereich von 5 - 30 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$.

Da die großen Cl^--Flüsse offenbar nicht mit Protonen elektrisch kompensiert werden und die Membranspannung im untersuchten pH-Bereich von 6 - 9 unabhängig von der Protonenkonzentration im Außenmedium erschien [13], wurden die pH-Messungen nicht weiter verfolgt.

6 Diskussion

6.1 Abschätzung der relativen Volumina der Zellkompartimente Cytoplasma und Vakuole.

Nach Angaben von [34] beträgt das Volumen des Cytoplasmas bei Acetabularia ca. 10% des Zellvolumens. Damit entspräche Acetabularia in dieser Beziehung durchaus einer typischen ausdifferenzierten Pflanzenzelle mit großer zentraler Vakuole und dünnem wandständigem Cytoplasmabelag. Eine derartige Kompartimentierung konnte jedoch im Rahmen der vorliegenden Arbeit für Acetabularia nicht bestätigt werden. Folgende Gründe sprechen dagegen:

1. Durch Zentrifugation lassen sich Cytoplasma und Vakuole voneinander trennen (vgl. 3.8). Das abzentrifugierte Cytoplasma macht etwa 20% des gesamten Zellvolumens aus. Dieser Befund spricht für ein Volumenverhältnis von Cytoplasma:Vakuole = 1:5.

2. Bei einem Volumenverhältnis von $V_{Cyt.}:V_{Vak.} = 1:10$ wäre die Dicke der cytoplasmatischen Schicht etwa $d_{Cyt.} = 0{,}05 \times r$, wobei r der Radius des Protoplasten ist. Eigene lichtmikroskopische Untersuchungen an schockgefrorenen (in Petroläther, gekühlt mit flüssigem Stickstoff) und anschließend gebrochenen Acetabularia-Zellen ergaben aber für die Dicke der cytoplasmatischen Schicht Werte von $d_{Cyt.} = 0{,}2 - 0{,}25 \times r$. Das entspricht einem Volumenverhältnis $V_{Cyt.} : V_{Vak.} \approx 1:1$.

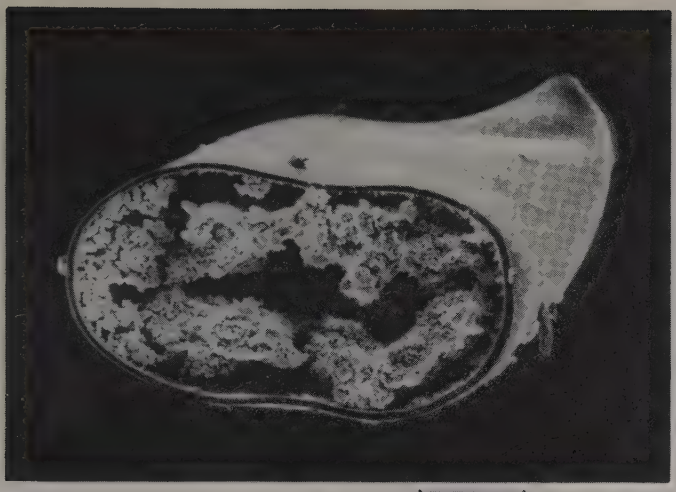


Abb. 41 : Acetabularia-Normalzelle, quergeschnitten.

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme:Dr.C.Sautter
(Präparation: Glutaraldehyd-Fixierung, Trocknung nach krit.Pkt., Gold-Palladium bedampft)

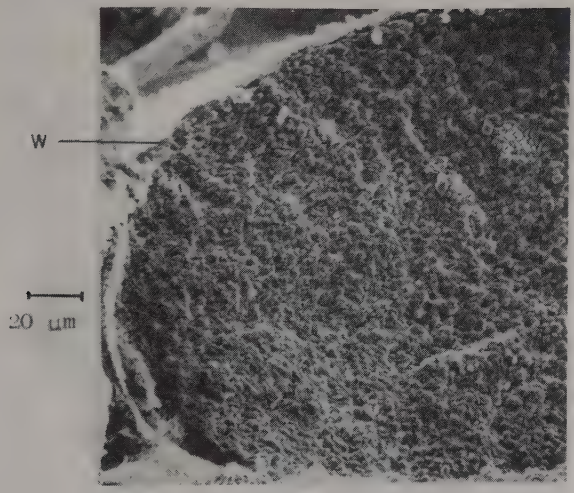


Abb. 42 : Acetabularia-"Stummel", Gefrierbruch

Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme:Dr.C.Sautter
(Präparation:Gefrierbruch, gefriergetrocknet, Gold-Palladium bedampft) W = Zellwand; das Zellinnere ist voll mit Chloroplasten.

3. Rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von quergeschnittenen Acetabularia-Zellen untermauern den lichtmikroskopischen Befund (vgl. Abb. 41).

Die Dicke der cytoplasmatischen Schicht der Alge in Abb. 41 beträgt 20 - 30 µm. Bei einem Zellradius in diesem Beispiel von 150 - 200 µm ergibt sich ein Volumenverhältnis von $V_{Cyt.}:V_{Vak.}$ = 1:2 bis 1:3.

Die cytoplasmatische Schicht erscheint im elektronenmikroskopischen Bild dünner als bei der lichtmikroskopischen Betrachtung. Die Ursache dafür ist wahrscheinlich eine Schrumpfung des Cytoplasmas infolge Entwässerung im Verlaufe der Präparation für die elektronenmikroskopische Aufnahme.

Die Dicke der cytoplasmatischen Schicht in normalen Zellen läßt also auf $V_{Cyt.}:V_{Vak.}$ = 1:1 bis 1:3 schließen, während das Volumen des Cytoplasma-Anteils einer Zelle nach der Zentrifugation (ca. 20% des Zellvolumens, s.o.) für ein 1:5 Verhältnis spricht. Diese Diskrepanz läßt sich dadurch erklären, daß bei den Bestimmungen der Cytoplasmadicke die zu beobachtende starke Vakuolisierung des Cytoplasmas unberücksichtigt blieb (vgl. Abb. 41).
Dadurch ergibt sich für d_{Cyt} ein zu großer Wert.

Auch andere Autoren [6,10,40] berichten, daß bis zu ca. 50% des Grundcytoplasmas von Acetabularia mit Vesikeln und kleinen Vakuolen durchsetzt ist, die zum Teil mit der großen "zentralen" Vakuole in Verbindung stehen. Frisch zentrifugierte Zell-"Stummel" erscheinen vollgestopft mit Cytoplasma und Chloroplasten, zeigen aber keine erkennbare Vakuolisierung (vgl. Abb. 42).

Demnach steht ein Verhältnis von 1:1 bis 1:3 für das Verhältnis : vakuolendurchsetztes Cytoplasma zu "zentraler" Vakuole, während Relationen von 1:5 und mehr etwa das Verhältnis zwischen Grundcytoplasma + Zellorganelle zum gesamten "Vakuolenkompartiment" darstellen.

Wie gezeigt wird, läßt sich dieser mikroskopische Befund mit den Ergebnissen der Flußanalysen (5.1.2.3.2 und 5.1.2.4), aber nicht mit den Angaben von [34], in Einklang bringen.

6.2 Transportmechanismen für K^+, Na^+ und Cl^-

6.2.1 Allgemeine Betrachtung

Der Transport von elektrisch geladenen Teilchen, im vorliegenden Falle K^+, Na^+ und Cl^-, durch biologische Membranen kann entweder passiv erfolgen oder aktiv, d.h. unter direkter Aufwendung von Stoffwechselenergie.

Reine Lipidmembranen sind für elektrisch geladene, hydrophile Teilchen nur schwer zu durchqueren. Die an Biomembranen tatsächlich gemessenen hohen Ionenflüsse lassen daher darauf schließen, daß es sich nicht um reine Lipidmembranen handeln kann, sondern daß mehr oder weniger spezifische "Ionenkanäle" in der Membran vorhanden sind, die passiv oder aktiv den Durchtritt der Ionen durch die Membran ermöglichen.

In Abb. 43 sind einige verschiedene Membrantransport-Systeme (A - G) schematisch dargestellt. Sie sollen im Folgenden kurz erläutert werden.

Abb. 43 A stellt den Transport durch einfache Diffusion - getrieben durch die elektrochemische Potentialdifferenz - über die Membran dar. Dieser Vorgang spielt, wie oben erwähnt, für unsere Betrachtungen eine untergeordnete Rolle, ist aber der Vollständigkeit halber berücksichtigt.

System B der Abb. 43 veranschaulicht die erleichterte Diffusion ("faciliated diffusion") durch hydrophile Ionenkanäle (z.B. Tunnelproteine) oder in der Membran

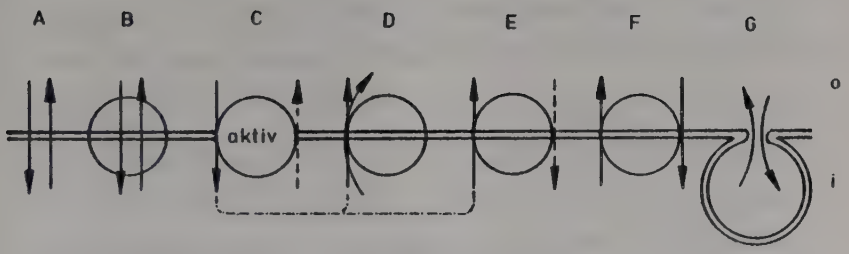


Abb. 43 : Schematische Darstellung verschiedener Ionen-transportsysteme (A - G)

A: einfache Diffusion durch die Membran

B: erleichterte Diffusion durch "Ionenkanäle"

C: aktiver Transport (unter direkter Aufwendung von Stoffwechselenergie); kann als elektrogene Pumpe arbeiten, z.B. wenn ein Antiport vorliegt mit einer Stöchiometrie $\neq$ 1:1

D: Symport

E: Antiport

F: Ion/Ion - Austausch-Diffusion

G: Vesikeltransport

diffusible Carrier (z.B. Valinomycin als K^+-Carrier). Dieser Transport ist ebenfalls spannungsabhängig. Die Ionen verteilen sich zu beiden Seiten der Membran entsprechend ihrem elektrochemischen Gleichgewicht. Derartige Ionenkanäle sind hauptsächlich Träger der elektrischen Leitfähigkeit der passiven Transportsysteme (z.B. in der Kälte).

Der aktive Transport (Abb. 43 C) in Form einer Stoffwechselenergie verbrauchenden Ionenpumpe kann unterschiedliche elektrische Eigenschaften haben. Handelt es sich um einen aktiven Antiport von Ionen gleicher Ladung (in Abb.43 C angedeutet durch unterbrochenen Pfeil), mit einer 1:1 Stöchiometrie, so haben wir eine elektroneutrale Ionenpumpe vor uns. Bei einer Stöchiometrie $\neq$ 1:1 oder gar bei einem strikt unidirektionellen Transport wird eine derartige Ionenpumpe zu einer elektrogenen Pumpe, die Netto-Ladung transportiert und so über der Membran eine Spannung aufbaut.

Das aktiv transportierte Ion wird in der Regel gegen seinen elektrochemischen Gradienten, energetisch betrachtet "bergauf", transportiert. Das Ion ist dann bestrebt, diesem Gradienten folgend wieder durch die Membran zurückzudiffundieren. An diesen Rücktransport können nun weitere Transportvorgänge, wie z.B. Symport (Abb.43 D) oder Antiport (Abb.43 E) anderer Ionen oder Moleküle gekoppelt sein. Diese Transportmechanismen können elektrisch in Erscheinung treten oder elektroneutral sein.

Zwei weitere Transportmechanismen, die immer elektroneutral sind und nicht zur elektrischen Membranleitfähigkeit beitragen sind für unsere Betrachtungen von Interesse. Abb.43 F zeigt die Austauschdiffusion ("exchange diffusion"), bei der ein Ion gegen ein anderes gleicher Ladung in strenger 1:1 Stöchiometrie ausgetauscht wird. Vor allem auf diesen Mechanismus sind die häufigen Unstimmigkeiten zwischen Messungen hoher Ionenflüsse und niedriger Membranleitfähigkeiten zurückzuführen.

Als letzter Transportmechanismus soll der Vesikeltransport erwähnt werden (Abb.43 G). Derart transportierte Ionen brauchen die Membran nicht zu durchqueren und können daher auch nicht zur elektrischen Leitfähigkeit der Membran beitragen. Die Ionenzusammensetzung innerhalb der Vesikel kann dabei sehr unterschiedlich sein und wird hauptsächlich von der Ionenzusammensetzung des Mediums, in dem die Vesikel gebildet wurden, abhängen. Dennoch sind Anreicherungs- oder Abgabevorgänge für einzelne Ionen denkbar (vgl. pulsierende Vakuolen bei Protozoen). Auch die chemische Zusammensetzung der Vesikelmembran kann letztlich durchaus verschieden sein von der chemischen Zusammensetzung der Membran, aus der die Vesikel ursprünglich gebildet wurden [38].

Im Folgenden soll versucht werden, die Ergebnisse der Flußmessungen und der elektrischen Messungen an Acetabularia zu einem widerspruchsfreien Gesamtbild der Ionentransportmechanismen dieser Alge zusammenzufügen.

6.2.2 Transportmechanismen bei $4^{o}C$

Betrachten wir zunächst die Transportsituation in der Kälte ($4^{o}C$), wenn aktive Prozesse entscheidend gehemmt sind und somit die passiven Transporteigenschaften quasi isoliert von aktiven in Erscheinung treten. Das Membranpotential in der Kälte, $E_{D,4^{o}}$, liegt bei ca. -70 mV. K^{+} ist dann annähernd im elektrochemischen Gleichgewicht zwischen Cytoplasma und Außen. Für Na^{+} besteht immer noch ein elektrochemisches Gefälle für den Einstrom von über 110 mV und für Cl^{-} beträgt die treibende Kraft 54 mV für den Ausstrom (vgl. Tab. 9).

Vergleicht man die typischen Efflux-Kinetiken in der Kälte von Na^{+} und Cl^{-}, so sind diese für Na^{+} 2-phasig und für Cl^{-} 1-phasig (vgl. 5.1.2.5.1 und 5.1.2.6). Die Zellen mit 2-phasiger Na^{+}-Effluxkinetik haben die gleiche Na^{+}-Innenkonzentration wie bei NT (ca. 80 mM), während Zellen mit 1-phasiger Na^{+}-Effluxkinetik im Vergleich zu NT eine signifikant ($p < 0,05$) erhöhte Na^{+}-Konzentration aufweisen (vgl. 5.1.2.5.2). Da den Zellen mit 1-phasiger Na^{+}-Efflux-Kinetik die Komponente 2 des Efflux fehlt, ist diese Komponente offensichtlich integraler Bestandteil des Na^{+}-Exportsystems.

Demgegenüber ist der Cl^{-}-Gehalt bei $4^{o}C$ sowohl bei Zellen mit 2-phasiger als auch bei Zellen mit 1-phasiger Cl^{-}-Efflux-Kinetik auf 50 - 60% des Wertes bei NT reduziert (vgl. Tab. 8). Dieser Cl^{-}-Verlust läßt sich damit erklären, daß der aktive Cl^{-}-Import bei $4^{o}C$ ausgefallen ist, und die

Tab. 9 : Zusammenfassung der wichtigsten Flußdaten für K^+, Na^+ und Cl^-

Ion	Zelle	T / °C	V_m / mV	c_o / mM	c_i / mM	E_j / mV	Φ_{io} / 10^{-8} Mol m^{-2} s^{-1}		g_j / 10^{-2} S m^{-2}	
							Komponente 2	Komponente 3	Komponente 2	Komponente 3
Na^+	NZ	4	≈- 70	461	80	+44	344 ± 73	24 ± 4,4	294 ± 60	20 ± 4
Cl^-	NZ	4	≈- 70	529	250	-16	131 ± 23		234 ± 11	
K^+	NZ	21	-180	10	400	-96	14 ± 1,4		16 ± 1	
Na^+	NZ	21	-180	461	80	+44	417 ± 102	17 ± 2	180 ± 44	7 ± 1
Na^+	ST	21	-190	461	165	+26	484 ± 20		227 ± 9	
Cl^-	NZ	21	-180	529	410	+ 6	1727 ± 210	230 ± 47	958 ± 116	128 ± 26
Cl^-	ST	21	-190	529	420	+ 6	550 ± 154		305 ± 85	
Cl^-	SH	21	-170	529	230	+21	156 ± 22		95 ± 13	

Algen entsprechend dem elektrochemischen Gradienten Cl^- abgeben. In der Tat beträgt der Cl^--Influx bei 4^oC weniger als 5% des Wertes bei NT (vgl. Tab. 2 und 8). Er ist mit $73 \pm 7 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$ der 1-phasigen Influx-Kinetik gegenüber dem Efflux der 1-phasigen Efflux-Kinetik von $131 \pm 23 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$ signifikant kleiner ($p < 0,01$).

Um die Frage nach den Transportmechanismen in der Kälte beantworten zu können, ist es wichtig, neben der Membranspannung, die zusammen mit den Ionenkonzentrationen innerhalb und außerhalb der Zelle Auskunft über die elektrochemischen Gradienten für die einzelnen Ionensorten gibt, auch die elektrische Membranleitfähigkeit zu berücksichtigen, um beurteilen zu können, inwieweit elektrisch in Erscheinung tretende oder elektroneutrale Transportmechanismen für den Ionentransport verantwortlich sind.

Die elektrische Leitfähigkeit des passiven Diffusionssystems (gemessen bei 5^oC) beträgt ca. 28×10^{-2}S m^{-2} für Spannungen negativer als E_K [14]. Davon macht allein die Leitfähigkeit des K^+-Diffusionssystems 15×10^{-2}S m^{-2} aus. Aus den K^+-Flüssen bei NT errechnet sich nach der allgemeinen Gleichung

$$g_j = (\Phi_j \times F)/(E_m - E_j) \qquad (6)$$

eine K^+-Leitfähigkeit von $16 \pm 1,6 \times 10^{-2}$S m^{-2}, die sehr gut mit den elektrisch gemessenen 15×10^{-2}S m^{-2} übereinstimmen. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung [14], daß die K^+-Leitfähigkeit nicht sehr temperaturabhängig ist.

Die Berechnung der Membranleitfähigkeit für Na^+ und Cl^- bei 4^oC ($E_m = E_{D,4^o}$) unter Verwendung der Daten aus Tab. 8 ergibt die in Tab.9 zusammengefaßten Werte. Nach Abzug

der elektrisch gemessenen K^+-Leitfähigkeit von der Gesamtleitfähigkeit des Diffusionssystems besitzt die Membran noch eine Leitfähigkeit von $13 \times 10^{-2} S\ m^{-2}$.

Wie Tab.9 zeigt, liegen die auf Grund von Flußmessungen ermittelten Werte für die Leitfähigkeiten von Na^+ und Cl^- weit über dem Wert von $13 \times 10^{-2} S\ m^{-2}$. Nur die Leitfähigkeit der langsamen Komponente 3 des Na^+-Efflux liegt mit $20 \pm 4 \times 10^{-2} S\ m^{-2}$ im Bereich der elektrisch gemessenen $13 \times 10^{-2} S\ m^{-2}$. Diese Komponente des Transportes wird wahrscheinlich durch erleichterte Diffusion stattfinden.

Damit repräsentieren die großen Na^+-Flüsse (K-2) und Cl^--Flüsse in der Kälte keinen Ladungstransport, da sie offensichtlich nicht zur Membranleitfähigkeit beitragen. Für diesen elektroneutralen Transport bieten sich, wie eingangs (6.2.1) erwähnt, 3 Mechanismen an:

1. Austauschdiffusion von Na^+ und Cl^-
2. Na^+Cl^- - Symport
3. Transport in Vesikeln.

zu 1.: Austauschdiffusion ist in diesem Falle sehr unwahrscheinlich, da Komponente 2 des Na^+-Efflux Teil des Netto-Na^+-Exportsystems ist (5.1.2.5). Ein Austauschsystem kann dagegen keine Netto-Ionenverschiebungen ermöglichen.

zu 2.: Ein elektroneutraler 1:1 Na^+Cl^--Symport aus der Zelle läßt sich bei $E_{D,4}{}^o$ nur so vorstellen, daß Cl^- entlang seinem elektrochemischen Gradienten nach außen wandert und dabei Na^+-Ionen "bergauf" aus der Zelle transportiert werden. Dieser Mechanismus ist ebenfalls unwahrscheinlich, da der elektrochemische Gradient bei

$E_{D,4}{}^{o}$ für Na^+ mit über 110 mV mehr als doppelt so groß ist wie der für Cl^- mit 54 mV und daher so ein Transportsystem Na^+Cl^- in die Zelle transportieren müßte. Die Cl^--Konzentration in der Kälte beträgt aber nur 50 - 60% des Wertes bei NT. Dieser Befund ist mit einer Anreicherung von Cl^- in der Zelle nicht vereinbar.

zu 3.: Der Transport in Vesikeln (Abb. 43 G) kann unabhängig vom elektrochemischen Gradienten der einzelnen Ionen erfolgen. Da die anderen Transportmechanismen nicht in Frage kommen, ist der Transport in Vesikeln wahrscheinlich für den beobachteten Efflux ohne gleichzeitige Beeinflussung der elektrischen Leitfähigkeit der Membran verantwortlich. Solch ein System kann auch beim Netto-Na^+-Export (vgl. 5.1.2.2.3 und 5.1.2.5) mitwirken. Über eine passive Beladung dieser Vesikel (evtl. über Cotransport) lassen sich gegenwärtig keine experimentell fundierten Mechanismen angeben.

6.2.3 Transportmechanismen bei Normaltemperatur (21°C)

6.2.3.1 Transport von K^+

Betrachten wir zunächst den relativ einfachen Fall der K^+-Flüsse. 1-phasige Flußkinetiken für Aufnahme und Abgabe von K^+ (vgl. 5.1.1.1 und 5.1.2.2) deuten daraufhin, daß das Plasmalemma für den K^+-Austausch geschwindigkeitsbestimmend ist. Der Tonoplast hat demzufolge die gleiche oder eine höhere K^+-Permeabilität.

Die Berechnungen der K^+-Leitfähigkeit der Membran aus den

K^+-Flüssen bei NT stimmt überein mit der elektrisch gemessenen K^+-Leitfähigkeit (vgl. Tab. 9 und [14]) des passiven K^+-Diffusionssystems.

Die in [30] dargestellte Spannungsabhängigkeit der K^+-Flüsse wird durch die Ergebnisse dieser Arbeit voll bestätigt (vgl. 5.2.1).

Diese Charakteristika des K^+-Flux lassen sich widerspruchslos mit einem Ionentransportmechanismus vom Typ "erleichterte Diffusion" (Abb. 44 B) erklären. Da bei RP ein Tracer-Efflux gemessen wird, obwohl bei dieser Membranspannung K^+ entlang dem elektrochemischen Gradienten netto in die Zelle fließt, muß zusätzlich noch ein elektroneutraler K^+/K^+- Austausch von etwa 10 - 15 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ erfolgen.

6.2.3.2 Transport von Na^+

6.2.3.2.1 Problemstellung

Die 2-phasigen Na^+-Effluxkinetiken lassen sich nur mit zusätzlichen Annahmen über das Verhältnis der Na^+- Konzentrationen in Cytoplasma und Vakuole (vgl. 5.1.2.3.7) formal mit einem "In-Serie"-Modell (K-2 = Cytoplasma, K-3 = Vakuole) in Einklang bringen. Doch gibt es auch einige experimentelle Befunde, die mit einem derartigen Modell garnicht zu erklären sind.

6.2.3.2.2 Abweichungen vom "In-Serie"-Modell; Flußanalysen

1. Mit $^{22}Na^+$ "durchmarkierte" Zellen lassen sich nach ihrem A^*_{02}/A^*_{03} - Verhältnis in 2 signifikant ($p < 0,01$) verschiedene Gruppen untergliedern (5.1.2.3.2). Eine Gruppe (A) zeigt ein Verhältnis $A^*_{02}/A^*_{03} \approx 1:1$, und die andere Gruppe (B) zeigt $A^*_{02}/A^*_{03} \approx 1:6$. Der Efflux aus K-2 ist bei beiden Gruppen ebenfalls signifikant verschieden ($p < 0,05$): $\Phi_{2,A} = 703 \pm 34 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$, $\Phi_{2,B} = 245 \pm 63 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$ während der Efflux aus K-3 bei beiden Gruppen etwa gleich ist ($15 \pm 4 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$ bzw. $19 \pm 2 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$).

2. Zellen mit $[Na^+]_i = 450$ mM $\approx [Na^+]_o$ zeigen ein Verhältnis $A^*_{02}/A^*_{03} \approx 1:10$. Bei diesen Zellen scheint die schnelle Komponente 2 des Efflux langsamer zu "laden" als Komponente 3 (vgl. Tab. 4 und 5.1.2.3.2).

zu 1.: Da die Gruppen A und B im Efflux aus K-3 übereinstimmen, darf man annehmen, daß die Unterschiede in K-2 nicht auf unspezifische Schädigungen der Zellen zurückzuführen sind.

Die Unterschiede zwischen den beiden Gruppen könnten Ausdruck einer unterschiedlichen Flußkompartimentierung sein. Ein Vergleich der relativen Größe der Flußkomponenten mit der relativen Größe der Zellkompartimente Cytoplasma und Vakuole (vgl. 6.1), unter der Annahme, daß Na^+ in K-2 und K-3 in gleicher Konzentration vorliegt führt zu einem interessanten Ergebnis.

Das Verhältnis der Flußkomponenten von Zellen der Gruppe A ($\approx 1:1$) entspricht dem Verhältnis von vesikeldurchsetztem

Cytoplasma zu Vakuole (≈ 1:1), während das Verhältnis der Flußkomponenten von Zellen der Gruppe B (≈ 1:6) dem Verhältnis: nicht-vesikuläres Cytoplasma zu Vakuole (≈ 1:5) entspricht. Setzen wir K-2(A) = vesikuläres Cytoplasma und K-2(B) = nicht-vesikuläres Cytoplasma, so lassen sich die unterschiedlich großen Flüsse aus K-2 folgendermaßen erklären.

K-2 repräsentiert kein flußkinetisch isoliertes Zellkompartiment, sondern stellt ein zusammengesetztes Flußkompartiment "Cytoplasma + Vesikel" dar. Die "Unterkompartimente" "Cytoplasma" und "Vesikel" treten in der Efflux-Kinetik nicht in Erscheinung und lassen sich deshalb flußkinetisch nicht trennen. Daraus läßt sich schließen: der Ionenaustausch der beiden "Unterkompartimente" "Cytoplasma" und "Vesikel" mit dem Außenmedium erfolgt unabhängig voneinander und mit annähernd der gleichen Zeitkonstanten. Die Einzelflüsse addieren sich zu einem Gesamtfluß aus K-2. Die konventionelle Kompartimentsanalyse ist auf ein derartiges System nicht anwendbar (vgl. 5.1.2.3.3).

Das Verhältnis der Flußkomponenten von Zellen der Gruppe B entspricht dem Verhältnis: nicht-vesikuläres Cytoplasma zu Vakuole (s.o.). Gleichzeitig zeigen diese Zellen einen kleineren Efflux aus K-2. Es liegt nahe, den geringeren Efflux mit den fehlenden Vesikeln in Zusammenhang zu bringen. Ist in K-2 von Zellen der Gruppe A ein Vesikeltransport enthalten, der bei Zellen der Gruppe B fehlt, so läßt sich dessen Größe abschätzen als $\Phi_{2,A} - \Phi_{2,B} \approx 450 \times 10^{-8} \text{Mol } m^{-2} s^{-1}$.

Wird Na^+ in den Vesikeln zusammen mit anderen Ionen, z.B. Cl^- transportiert, und liegen diese Ionen in den Vesikeln in gleicher Konzentration vor wie in der Zelle, so errechnet sich aus $[Na^+]_i : [Cl^-]_i \approx 1:5$ (vgl. Tab. 9) für Cl^- ein Vesikeltransport von ca. 2200 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Dieser Wert liegt tatsächlich im Bereich der Werte für den Cl^--Efflux aus K-2 (1727 ± 210 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$, vgl. Tab. 9).

zu 2.: Dieser Befund ist mit einer "In-Serie"-Anordnung unvereinbar. Nur unter Annahme eines direkten Ionenaustausches zwischen Außenmedium und K-3 ist es zu verstehen, daß der Anstieg der radioaktiven Spezifität in der langsamen Effluxkomponente schneller erfolgt als in der schnellen.

Wenn K-3 = Vakuole, könnte ein direkter Ionenaustausch dadurch vermittelt werden, daß der Tonoplast stellenweise direkt an das Plasmalemma grenzt. So könnten Ionen über Plasmalemma und Tonoplast direkt in die Vakuole gelangen, ohne in das Cytoplasmakompartiment einzutreten. In der Tat lassen sich elektronenmikroskopisch solche Zonen bei Acetabularia beobachten (SPRING, pers. Mitteilung).

Eine zweite Erklärungsmöglichkeit wäre wiederum ein Vesikeltransport, der einen direkten Austausch zwischen Außenmedium und Vakuole vermitteln könnte.

Um die eingangs geschilderten Flußphänomene erklären zu können, wird auch für den Na^+-Transport bei NT neben einem Transport über das Plasmalemma ein Transport in Vesikeln postuliert.

6.2.3.2.3 Vergleich: Normalzellen - Zell-"Stummel"; $^{22}Na^+$, $^{36}Cl^-$.

Der Na^+-Efflux der ST entspricht mit 484 ± 20 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ dem mittleren Na^+-Efflux aus K-2 der NZn (vgl. Tab. 9). Wie jedoch im vorhergehenden Abschnitt gezeigt werden konnte, kann K-2 nicht ohne weiteres im Sinne der konventionellen Kompartimentsanalyse dem Kompartiment Cytoplasma zugeordnet werden. Der Efflux aus STn scheint jedoch für diese Annahme zu sprechen.

Da das Cytoplasma der ST nach der Zentrifugation nicht erkennbar vakuolisiert ist, muß der Efflux der ST ein Plasmalemma-Flux sein. Ein Vergleich mit dem Cl^--Efflux aus STn (vgl.Tab. 9) zeigt, daß der Cl^--Efflux mit 550 ± 154 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ dem Na^+-Efflux der ST entspricht. Na^+ und Cl^- sind demnach bei STn (= am Plasmalemma) elektrisch ungefähr kompensiert. Vergleichen wir jedoch den Efflux von Na^+ und Cl^- bei NZn, die sowohl für Na^+ als auch für Cl^- ein Verhältnis $A^*_{02}/A^*_{03} \approx 1:1$ aufweisen (vgl. Tab. 6, Tab. 7, bzw. Tab. 9), so ergibt sich folgendes Bild (Tab. 10).

Tab. 10 : Vergleich von Zellen, die sowohl für $^{36}Cl^-$ als auch für $^{22}Na^+$ eine Flußkompartimentierung von 1:1 zeigen

Ion	Zelle	A^*_{02}/A^*_{03}	Efflux $\cdot 10^{-8}$Mol m^{-2} s^{-1}		Φ_2 10^{-8}Mol m^{-2} s^{-1}	
			I_2	I_3	Membran-transport	Vesikel-transport
Na^+	NZ	1:1	700	15	250	450
Cl^-	NZ	1:1	1700	230	230	1700
Na^+	ST	-	500		500	-
Cl^-	ST	-	550		550	-

Der unter 6.2.3.2.2 abgeschätzte Na^+-Membrantransport ($\approx 250 \times 10^{-8}$Mol $m^{-2}s^{-1}$) entspricht gerade dem Efflux aus K-3 der Cl^--Efflux-Kinetik (230×10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$). Damit wäre der Fluß aus K-3 der Cl^--Efflux-Kinetik elektrisch mit Na^+ kompensiert, wie das bei den STn der Fall ist.

Der Membrantransport von Na^+ ist in STn um den Faktor 2 erhöht. Da wegen der elektrischen Kompensierung anzunehmen ist, daß der Cl^--Fluß über das Plasmalemma dann um den gleichen Faktor größer ist und der Cl^--Efflux aus STn gerade dem doppelten Wert des Efflux aus K-3 entspricht, ist mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß der Efflux aus K-3 einem Plasmalemma-Flux entspricht.

Daraus läßt sich folgern:

1. Der Na^+-Efflux von STn ist nicht identisch mit dem mittleren Efflux aus K-2 der NZn, sondern entspricht einem um den Faktor 2 gesteigerten Membrantransportanteil aus K-2 der NZn (vgl. 6.2.3.2.2).

2. Der Efflux aus K-3 der Cl^--Efflux-Kinetik bei NT ist ein Plasmalemma-Flux ! Dieser Befund ist mit einer serialen Anordnung der Flußkompartimente unvereinbar. In STn ist dieser Efflux um den Faktor 2 gesteigert. Dieser Befund deckt sich mit den Ergebnissen von [11]: ST zeigen gegenüber NZn eine deutlich höhere elektrische Leitfähigkeit (vgl. Leitfähigkeiten Tab. 9).

3. K-2 der Cl^--Efflux-Kinetik stellt wahrscheinlich ein Vesikeltransportsystem dar (vgl. 6.2.3.2.2).

6.2.3.3 Transport von Cl^-

Die $^{36}Cl^-$- Aufnahme- und Abgabekinetiken bei NT sind 2-phasig (Abb. 16). Dieser Befund bestätigt die Ergebnisse von [20] und widerspricht den Angaben von [34].

3.2.3.3.1 Problemstellung

Die Cl^--Flüsse sind auffallend groß. Mit 1727 ± 210 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ aus der schnellen Komponente 2 liegt der Cl^--Efflux mindestens 5 mal höher als der jedes anderen untersuchten Ions (vgl. Tab. 9). Der Efflux aller untersuchten Kationen kann allenfalls 30 % des Cl^--Efflux aus K-2 elektrisch kompensieren (vgl. Tab. 9).

Unter der Annahme, daß es sich bei diesem Cl^--Efflux um unabhängigen Ladungstransport handelt, errechnet sich die Cl^--Leitfähigkeit bei NT und RP zu ca. 960 x 10^{-2}S m^{-2} (vgl. Tab. 9). Das ist mehr,als die gesamte elektrische Leitfähigkeit unter diesen Bedingungen beträgt (ca. 600 x 10^{-2}S m^{-2}) [14]. Damit muß zumindest ein großer Teil dieses Cl^--Efflux elektroneutral sein.

Demzufolge bleiben als mögliche Transportmechanismen: elektroneutraler Symport oder Transport in Vesikeln mit Gegenionen, die im Rahmen dieser Arbeit nicht alle gefunden wurden, sowie elektroneutraler Cl^-/Cl^-- Austausch.

6.2.3.3.2 Vergleich: Normalzellen - Zell-"Stummel"-Zell-"Schläuche"

Der Cl^-- Efflux einer NZ ist nicht die Summe des Efflux von STn und SHn. Der Fluß aus der schnellen Komponente 2 der NZn beträgt ca. das 3-fache des Efflux von STn und mehr als das 10-fache des Efflux von SHn. Durch das Zentrifugieren und Trennen ist offensichtlich ein Transportmechanismus beeinträchtigt worden, der nur im Zusammenwirken von Cytoplasma und Vakuole einer intakten Zelle funktioniert (vgl. auch die Situation beim Na^+-Efflux, 6.2.3.2).

Da ST und SHe ein Membranpotential zeigen, das etwa dem der NZn entspricht (ST negativer als NZ negativer als SH), muß die elektrogene Pumpe am Plasmalemma lokalisiert (SHe haben Tonoplast und Plasmalemma) und intakt sein [11]. Folglich kann der große Efflux aus K-2 nicht der Tätigkeit der elektrogenen Pumpe zugeordnet werden, da er bei STn und SHn, wie gezeigt, nicht auftaucht. Er ist zudem offensichtlich für die elektrischen Phänomene der Alge, soweit sie im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, nicht von Bedeutung, da ST im Prinzip die gleichen elektrischen Eigenschaften zeigen wie NZn (z.B. licht-induzierte APe, spontane APe, Reizsummierung, Refraktärstadium, schnelle Lichtreaktionen, vgl. 5.2.3.2). Gleichzeitig ist dieser Efflux aber sehr spannungsabhängig (vgl. Abb. 39 B).

Wie unter 5.2.3.4 ausgeführt, beträgt der spannungsabhängige Cl^--Efflux aus K-2 bei V_m = - 100 mV nur noch ca. 20% des Wertes bei RP = -180 mV (Abb. 39 B). Bei linearer Extrapolation dieses spannungsabhängigen Flusses zwischen V_m = -160 und V_m = -120 mV verschwindet dieser Efflux bei E_D. Damit findet der Brutto-Efflux aus K-2 nur statt, wenn das Membranpotential negativer als das Diffusionspotential ist, also bei aktiver elektrogener Pumpe. Dieser Befund läßt auf eine sehr enge Korrelation zwischen dem elektroneutralen Efflux aus K-2 und der Aktivität der elektrogenen Pumpe schließen. In der Tat zeigt die frühe Leitfähigkeit g_o der Acetabularia-Membran im untersuchten Spannungsbereich von -190 bis -120 mV eine ähnliche Spannungsabhängigkeit wie der Efflux aus K-2 [14].

Diese auffällige Koppelung bei NZn tritt allerdings bei STn und SHn nicht auf, wie ein Vergleich der Fluß/Spannungs-Charakteristik von NZn, STn und SHn (vgl. Abb. 39 und Abb. 40) zeigt.

Der spannungsabhängige Cl^--Efflux von STn und SHn ist nicht mit dem von K-2, sondern mit dem von K-3 der NZn zu vergleichen. (Ein weiteres Indiz, daß es sich bei K-3 der NZn tatsächlich um einen Plasmalemma-Flux handelt !). Damit kann ausgeschlossen werden, daß der große Efflux aus K-2 der NZn in STn oder SHn nur betragsmäßig verringert ist und daher in den Flußmessungen nicht mehr gravierend in Erscheinung tritt. Auch ein reduzierter K-2 Efflux müßte bei STn oder SHn noch die gleiche Spannungsabhängigkeit

zeigen wie bei NZn.

Damit befinden wir uns in der für Transportphysiologen in der Tat ungewöhnlichen Situation, eine Efflux-Komponente einer 2-phasigen Efflux-Kinetik 2 verschiedenen Zellkompartimenten, nämlich Cytoplasma und Vakuole, zuordnen zu müssen, die zudem nur als physiologisch intakte Einheit diese Komponente zeigen. Ebenso ungewöhnlich ist, wie auch unter 6.2.3.2.3 gezeigt, daß es sich bei K-3 der Efflux-Kinetik offensichtlich um einen Plasmalemma-Flux handelt.

6.2.3.3.3 Transportmechanismus für die schnelle Cl^--Efflux-Komponente 2

Betrachten wir zunächst den elektroneutralen, spannungsabhängigen Cl^--Efflux aus K-2. Folgende Transportmechanismen könnten diesem Cl^--Transport zugrunde liegen:

- Symport von Cl^- mit einem einwertigen Kation (Abb. 43 D)
- Cl^-/Cl^- - Austauschdiffusion (Abb. 43 F)
- Vesikeltransport (Abb. 43 G)

Im Folgenden wird knapp dargestellt, welche Argumente für oder gegen die vorgeschlagenen Transportmechanismen sprechen.

1. Symport

- pro: - elektroneutral, trägt nicht zur Membranleitfähigkeit bei
  - kann spannungsabhängig sein

- contra: - fehlt in STn und SHn
  - 1:1-Stöchiometrie erforderlich, konnte nicht nachgewiesen werden

2. Cl^-/Cl^- - Austauschdiffusion

- pro : - elektroneutral, trägt nicht zur Membranleitfähigkeit bei
  - kann spannungsabhängig sein
  - kein Gegenion erforderlich

- contra: - fehlt in STn und SHn

3. Vesikeltransport

- pro : - elektroneutral, trägt nicht zur Membranleitfähigkeit bei
  - kann spannungsabhängig sein
  - fehlt in nicht-vakuolisierten STn und cytoplasmafreien SHn
  - K-2 ist verantwortlich für die Cl^--"Ausbrüche" (vgl. 5.2.3.1); diese Ausbrüche fehlen in frisch zentrifugierten STn und SHn, erscheinen aber mit zunehmender Vakuolisierung des Cytoplasmas der Zellabschnitte wieder (Beispiel unter 5.2.3.2)

- contra: - nur Na^+ konnte als Gegenion für Cl^- in Vesikeln belegt werden (6.2.3.2.3), damit ist das Cl^- in den Vesikeln aber nur zu ca.20% elektrisch kompensiert.

Fassen wir zusammen: Einzig der Vesikeltransport ist in der Lage, das Fehlen der Komponente 2 in STn und SHn zu erklären. Die kurzfristigen Cl^--"Ausbrüche" im Verlaufe der Effluxexperimente mit simultaner Messung der Membranspannung lassen sich ebenfalls nur mit dem Vesikeltransport erklären,

ebenso wie das Ausbleiben dieser "Ausbrüche" bei frisch zentrifugierten STn und SHn.

Deshalb wird K-2 des Cl^--Efflux einem Vesikeltransport-System zugeordnet, das den Austausch zwischen Vakuole und Außenmedium vermittelt.

Außer Na^+ wurde kein Gegenion für den geforderten Cl^--Transport in Vesikeln nachgewiesen. Allerdings haben die simultanen Messungen von Na^+-Efflux und Membranspannung - wie bereits erwähnt (5.1.2.3.5) - aus methodischen Gründen nur begrenzte Aussagekraft. Die Frage nach der elektrischen Kompensierung der Anionen in den Vesikeln muß dabei offen bleiben. Bei Cl^-/Cl^-- Austausch wäre sie gelöst; allerdings müßte dieser dann bei den zentrifugierten Systemen (ST und SHe) erheblich beeinträchtigt sein.

Für den Fall, daß der große Cl^--Efflux über Transportvesikel läuft, läßt sich die Anzahl der geforderten Vesikel folgendermaßen abschätzen.

Bei einem Cl^-- Brutto-Efflux von 2000×10^{-8} Mol $m^{-2}s^{-1}$, und einem mittlerem Volumen solcher Vesikel von $3 \times 10^{-17} m^3$ (geschätzt anhand elektronenmikroskopischer Aufnahmen [6,10,40]), müssen ca. 2×10^8 Vesikel $m^{-2}s^{-1}$ an der Membran entleert werden. Daraus ergibt sich, daß ein und dieselbe Stelle der Membran von der Fläche eines Vesikelquerschnitts etwa alle 8 min mit einem Vesikel verschmelzen würde.

6.2.3.3.4 Transportmechanismus für die Komponente 3 des Cl^--Efflux

Wie gezeigt werden konnte, entspricht die Komponente 3 des Cl^--Efflux einem Plasmalemma-Flux (6.2.3.2.3 und 6.2.3.3.2). Dieser Fluß ist in STn gegenüber NZn gesteigert, während SHe einen kleineren Efflux als NZn aufweisen (vgl. Tab.9). Das gleiche gilt nach [11] für die elektrischen Leitfähigkeiten von NZn, STn und SHn. Dieser Befund wird von [11] als Folge einer erhöhten Aktivität der elektrogenen Cl^--Pumpe bei STn aufgrund des gegenüber NZn vergrößerten Verhältnisses von Cytoplasmavolumen/ Membranfläche interpretiert (entsprechendes gilt für die elektrische Leitfähigkeit der SHe).

Der Cl^--Flux durch die elektrogene Pumpe muß demnach in K-3 enthalten sein.

Gehen wir davon aus, daß der in der Kälte gemessene passive Anteil des Cl^--Flux von ca. 130 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ nicht sehr temperaturabhängig ist, so ergibt sich der aktive Anteil aus K-3 zu:Flux(NT) - Flux(4^o) = Flux(aktiv) = 100 - 140 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ bei NZn, ca. 400 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$bei STn und ca. 25 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$ bei SHn. Stellt dieser aktive Anteil den Flux durch die elektrogene Pumpe dar, so läßt sich der Pumpenstrom I_p berechnen als

$$I_p = \Phi_P \times F \quad , \qquad (7)$$

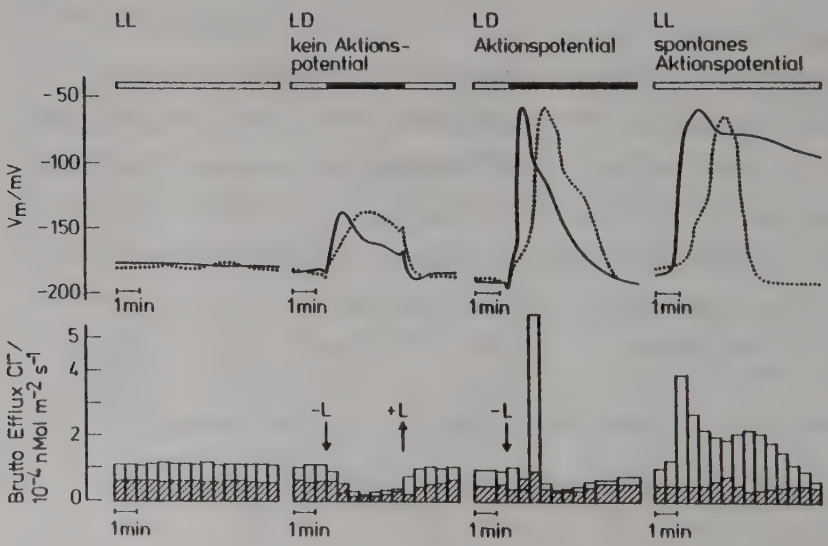
wobei F die Faraday-Konstante ist. Hieraus ergeben sich die Pumpenströme bei NZn = 10 - 13 x 10^{-2}A m^{-2}, STn = ca. 40 x 10^{-2}A m^{-2} und SHn = ca. 2,5 x 10^{-2}A m^{-2}.

Diese Abschätzung stimmt gut mit den elektrisch gemessenen Pumpenströmen von 10 - 60 x 10^{-2}A m^{-2} überein [14].

Damit enthält der Efflux aus K-3 neben einem passiven Transportanteil den Flux durch die elektrogene Cl^--Pumpe.

Dann ist in der Fluß/Spannungscharakteristik von K-3 auch der spannungsabhängige Fluß durch die elektrogene Pumpe enthalten (vgl. Abb. 39). Dieses Ergebnis steht in vollem Einklang mit den Resultaten der Strom/Spannungs-charakteristik der elektrogenen Pumpe im Gleichgewicht, mit einem Bereich negativer differentieller Leitfähigkeit (ca. -150 bis -100 mV), nach der der Pumpenstrom für große Depolarisierungen von der elektromotorischen Kraft der Pumpe ($E_P \approx$ -190 mV) wieder wesentlich kleiner wird [14].

Abb. 44 : Vergleichende Gegeüberstellung des spannungs-abhängigen Cl^--Efflux von Normalzellen (durchgezogene Kurve) und Zell-"Stummeln" (unterbrochene Kurve). Licht:ca.80 W m^{-2}



6.3 Spannungsabhängiger Cl^--Efflux im Verlaufe von Aktionspotentialen

Betrachten wir anhand von Abb. 44 noch einmal typische spannungsabhängige Cl^--Effluxänderungen bei NZn und bei frisch zentrifugierten STn. Wird die Membranspannung V_m im Verlaufe eines lichtinduzierten oder spontanen Aktionspotentials positiver als ca. -100 mV, so kann es, wie gezeigt wurde (5.2.3.1), bei NZn zu drastischen Cl^--Effluxsteigerungen (bis ca. 6000 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$) kommen (vgl. Abb. 44, LD, Aktionspotential und LL, spontanes Aktionspotential). Jedoch sind diese Abgabesteigerungen, wie ebenfalls gezeigt wurde (5.2.3.1), nicht so streng mit der Membranspannung korreliert, wie etwa der $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux bei Spannungen positiver als E_K. Allerdings sind diese Cl^--"Ausbrüche" typisch für vakuolisierte Zellen, bei nicht-vakuolisierten Zellen wurden sie nicht beobachtet.

Dennoch zeigen auch nicht-vakuolisierte "Stummel" im Verlaufe eines Aktionspotentials eine gesteigerte Cl^--Abgabe bei Spannungen, die positiver als ca. -100 mV sind, aber der Cl^--Efflux erreicht dabei höchstens Werte von ca. 1000 x 10^{-8}Mol $m^{-2}s^{-1}$. Wie ein Vergleich der Fluß/Spannungskurven (Abb. 39 und Abb. 40) zeigt, entspricht dieser spannungsabhängige Cl^--Efflux dem aus K-3 der Normalzellen. Damit handelt es sich in beiden Fällen um einen spannungsabhängigen Cl^--Flux am Plasmalemma.

Im Gegensatz zu dem spannungsabhängig gesteigerten $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux bei V_m positiver $E_K \approx -90$ mV, ist eine Steigerung des Cl^--Efflux schon ab V_m positiver als -110 bis -100 mV zu beobachten (vgl. Abb.39 A, Abb.40, [30]).

Demnach erfolgt im Verlaufe der Depolarisierungsphase eines Aktionspotentials die Steigerung der Cl^--Abgabe zeitlich vor der $K^+(^{86}Rb^+)$-Abgabe.

Es soll daher geprüft werden, ob diese zeitliche Verschiebung des spannungsabhängig gesteigerten Efflux von Cl^- und $K^+(^{86}Rb^+)$ eine Funktion für das Aktionspotential bei Acetabularia haben könnte.

Eine detaillierte Analyse des Aktionspotentials von Acetabularia ist in [15] gegeben.

Im Verlaufe eines Aktionspotentials sinkt - im Gegensatz zu dem AP von Nerven - die elektrische Leitfähigkeit der Membran zunächst, bis die Membranspannung ca. -100 mV beträgt [15], um bei positiveren Membranspannungen drastisch anzusteigen. Da diese "kritische" Membranspannung im Bereich von $E_K \approx -90$ mV liegt, wurde diese Erhöhung der Leitfähigkeit bisher der gesteigerten Leitfähigkeit für den K^+- Ausstrom bei Spannungen positiver als E_K zugeschrieben [15]. Mit den Daten der Fluß/Spannungskurven (Abb. 39 und Abb. 40) läßt sich die etwas "zu früh" (bei ca. -100 mV, gegenüber E_K ca. -90 mV) auftretende Erhöhung der elektrischen Leitfähigkeit jedoch wie folgt deuten.

Im Verlaufe eines Aktionspotentials steigt zunächst der Widerstand im elektrogenen "Pumpenkanal". Das führt dazu, daß die Membranspannung aufgrund der nicht-linearen Strom/Spannungscharakteristik diskontinuierlich etwa E_D erreicht [15]. Erfolgt im Verlaufe dieses Vorganges bei Spannungen um etwa - 100 mV eine vorübergehende Permeabilitätserhöhung für Cl^-, so fließt Cl^- passiv entlang dem elektrochemischen Gradienten (E_{Cl} = 0 mV) aus der Zelle. Das hat zur Folge, daß E_m über E_D hinaus depolarisiert wird, wie wir es auch während eines APs beobachten. Im Verlaufe dieser zusätzlichen Depolarisierung wird die Membranspannung positiver als E_K. Das aber hat, wie gezeigt wurde (5.2.1; [30]) einen drastisch gesteigerten $K^+(^{86}Rb^+)$-Efflux zur Folge, der die Membran nun hyperpolarisiert und die beobachtete Repolarisierung auf E_K bewirkt. Die weitere Repolarisierung auf RP erfolgt dann aktiv durch die elektrogene Pumpe.

Damit existiert bei Acetabularia im Verlauf des "metabolischen" APs [15] mit einer Amplitude von etwa 80 mV ein "konventionelles" AP mit einer zusätzlichen Amplitude von ca. 30 mV, dessen Mechanismus auf einer zeitlich verschobenen spannungsinduzierten Permeabilitätserhöhung für Cl^- und K^+ beruht.

In der Tat zeigt Acetabularia in der Kälte oder unter Einfluß von Stoffwechselinhibitoren (z.B.DNP), wenn das Membranpotential bei E_D liegt, spontan vorübergehende Depolarisierungen bis auf ca. -50 mV (GRADMANN, pers.Mitteilung) die durch die beschriebenen,zeitlich verschobenen Permeabilitätserhöhungen für Cl^- und K^+ erklärt werden können.

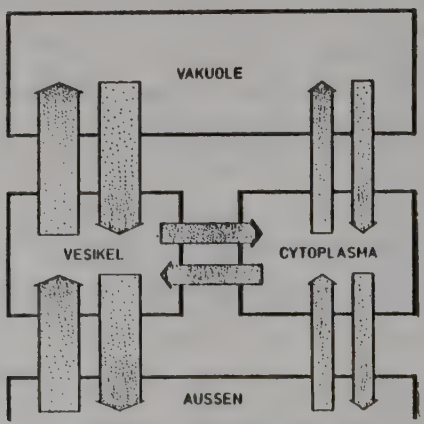
Der zeitliche Verlauf dieser Membranspannungsänderungen läßt sich durchaus mit dem Spannungsverlauf eines "normalen" APs bei Spannungen positiver E_K vergleichen.

Dieser Mechanismus der zeitlich verschobenen Permeabilitätserhöhungen für Cl^- und K^+ hat große Ähnlichkeit mit dem Mechanismus, der für das Aktionspotential bei Chara und Nitella beschrieben wurde [24].

6.4 Quantitative Behandlung von Vesikeltransport.

Wie gezeigt werden konnte, lassen sich viele Ergebnisse von Flußmessungen an Acetabularia nur durch ein Vesikeltransport-System erklären. Eine mögliche flußkinetische Anordnung für ein derartiges Transportsystem ist in Abb.45 wiedergegeben.

Abb. 45: Modell für den vorgeschlagenen Vesikeltransport



Läßt sich ein "In-Serie"-Modell der flußkinetischen Kompartimentierung mit dem Formalismus der konventionellen Kompartimentsanalyse ausreichend beschreiben, wird die mathematische Behandlung eines Modelles wie in Abb. 45 sehr komplex.

Unter der vereinfachenden Annahme, daß die Reaktionskonstanten des Ionenaustausches für die Hin- und Rückreaktion gleich sind, müssen zur quantitativen Beschreibung des Modells immer noch 5 verschiedene Reaktionskonstanten bestimmt werden. Mit Auswaschkinetiken werden aber bei Acetabularia nur höchstens 2 Reaktionskonstanten gemessen, hinter denen sich die anderen in irgendeiner Weise verbergen. Es konnte ja bereits gezeigt werden, daß es bei Acetabularia flußkinetische "Mischkompartimente" gibt, die sich in der Effluxkinetik nur als eine einzige Komponente zeigen (6.2.3.3.2).

Einige Autoren sind sogar der Meinung, daß sich ein derartiges System rechnerisch überhaupt nicht exakt erfassen läßt [24]. Dessenungeachtet wird zur Zeit versucht, mit Hilfe von Computerprogrammen und elektrischen Analogschaltkreisen das vorgeschlagene Modell zu simulieren, um auf diesem Wege den Vesikeltransport bei Acetabularia auch quantitativ beschreiben zu können.

7 Zusammenfassung

Bei der einzelligen marinen Grünalge Acetabularia mediterranea wurden mit Hilfe der Tracer-Fluß-Analyse die Flüsse der Ionen K^+($^{42}K^+$, $^{86}Rb^+$), Na^+($^{22}Na^+$) und Cl^-($^{36}Cl^-$) in stationären Zuständen bei 21°C und bei 4°C, wenn aktive Prozesse gehemmt sind, untersucht.

Simultane Messung von Membranspannung und Ionenflüssen ermöglichte es, Transportmechanismen für diese Ionen in dynamischen Zuständen in Abhängigkeit von Licht, Strom und Membranspannung zu analysieren. Diese Technik wurde auf Einzelzellen und auf vakuolenfreie sowie cytoplasmaarme Zellabschnitte angewendet.

Die Voraussetzungen für die Anwendung der konventionellen Kompartimentsanalyse nach dem Modell: Außen - Cytoplasma - Vakuole in Serie, sind für die Flüsse der Ionen Na^+ und Cl^- bei Acetabularia nicht gegeben. Alternative Modelle mit mehreren Transportmechanismen, z.B.:

- Vesikeltransport
- Ion/Ion - Austausch
- Symport
- erleichterte Diffusion
- elektrogener Transport

werden vorgeschlagen und diskutiert.

Folgende Ergebnisse sind besonders hervorzuheben:

- $^{42}K^+$ und $^{86}Rb^+$ als Tracer für K^+ bei Acetabularia führen qualitativ zu gleichen Ergebnissen. Die Acetabularia-Membran ist jedoch für K^+ 5 - 10 mal permeabler als für Rb^+.

- Aus der langsamen Komponente der 2-phasigen $^{36}Cl^-$-Efflux-Kinetik bei 21°C lassen sich mindestens 2 Transportsysteme im Plasmalemma ermitteln, ein passives Diffusionssystem und ein elektrogener Fluß. Die Spannungsabhängigkeit dieser Flußkomponente steht in vollem Einklang mit elektrisch gemessenen Strom/Spannungscharakteristiken der elektrogenen Pumpe.

- Es wurde nachgewiesen, daß für das Cl^--Ion der Efflux aus einer Acetabularia-Zelle nicht gleich der Summe des Efflux aus isolierten Cytoplasma- und Vakuolenabschnitten ist.

- Neben dem "metabolischen" Aktionspotential bei Acetabularia existiert ein "konventionelles" Aktionspotential, das nach dem Mechanismus zeitlich verschobener Permeabilitätserhöhungen für Cl^- und K^+ abläuft.

8 Literatur

1 Apostolova, R.D.
Ksenzhek, O.S.
Effect of ionic composition of the external medium on the intracellular potential of the alga Acetabularia
Biofizika 22, 90-95 (1977)

2 Bentrup, F.W.
Lichtabhängige Membranpotentiale bei Pflanzen
Ber.Deutsch.Bot.Ges. 87, 515-528 (1974)

3 Bentrup, F.W.
Cell electrophysiology and membrane transport
Progr.Bot. 37, 64-77 (1975)

4 Bentrup, F.W.
Cell Physiology. Cell electrophysiology and membrane transport
Progr.Bot. 40, 84-98 (1979)

5 Beth, K.
Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf die Formbildung von kernhaltigen und kernlosen Acetabularia-Zellen
Z.Naturforsch. 8 b, 334-342 (1953)

6 Bouck, G.B.
Fine structure in Acetabularia and its relation to protoplasmic streaming
in: Primitive motile systems in biology, R.D.Allen ed.,Academic Press New York and London
7-17 (1964)

7 Brändle, E.P.O.
Kötter, R.
Zetsche, K.
Changes of pH in culture solution of Acetabularia caused by proton flux
Protoplasma 83, 173 (1975)

8 Cram, W.J.
Compartmentation and exchange of chloride in carrot root tissue
Biochim.Biophys.Acta 163, 339-353 (1968)

9 Cram, W.J.
Chloride transport in vesicles. Implications of colchicine effects on Cl influx in Chara, and Cl exchange kinetics in maize root tips
in: Ion transport in Plants, W.P.Anderson ed., Academic Press London and New York 419-426 (1973)

10 Franke, W.W.
Spring, H.
Kartenbeck, J.
Falk, H.
Cyst formation in some Dasycladacean green algae. I. Vesicle formations during coenocytotomy in Acetabularia mediterranea
Europ.J.Cell Biol. 14, 229-252 (1977)

11 Freudling, C.
Gradmann, D.
Cable properties and compartmentation in Acetabularia
Biochim.Biophys.Acta Nr. 78327 in print (1979)

12 Gläsel, R.M.
Zetsche, K.
^{36}Chloride fluxes of Acetabularia mediterranea
Protoplasma 83, 175 (1975)

13 Gradmann, D. Einfluß von Licht, Temperatur und Außenmedium auf das elektrische Verhalten von Acetabularia crenulata Planta 93, 323-353 (1970)

14 Gradmann, D. Analog circuit of the Acetabularia membrane J.Membrane Biol. 25, 183-208 (1975)

15 Gradmann, D. "Metabolic"action potentials in Acetabularia J.Membrane Biol. 29, 23-45 (1976)

16 Gradmann, D. Green light (550 nm) inhibits electrogenic Cl^- pump in the Acetabularia membrane by Permeability increase for the carrier ion J.Membrane Biol. 44, 1-24 (1978)

17 Gradmann, D. Bentrup, F.W. Light-induced membrane potential changes and rectification in Acetabularia Naturwissenschaften 57, 46-47 (1970

18 Gradmann, D. Klemke, W. Current-voltage relationship of the electrogenic pump in Acetabularia in: Membrane transport in plants, U.Zimmermann and J.Dainty eds., Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York 131-138 (1974)

19 Gradmann, D.
Schibel, M.
Effects of light on the electrogenic pump in Acetabularia
in: Exchanges ioniques transmembraires chez les vegeteaux
M.Thellier et al. ed.
325-332 (1976) C.R.N.S.

20 Gradmann, D.
Wagner, G.
Gläsel, R.M.
Chloride efflux during light - triggered action potentials in Acetabularia mediterranea
Biochim.Biophys.Acta 323, 151-155 (1973)

21 Gunn, R.B.
Dalmark, M.
Tosteson, D.C.
Wieth, J.O.
Characteristics of chloride transport in human red blood cells
J.Gen.Physiol. 61, 185-206 (1973)

22 Hämmerling, J.
Zur Lebensweise, Fortpflanzung und Entwicklung verschiedener Dasycladaceen
Arch.Protistenk. 97, 7-56 (1944)

23 Hope, A.B.
Ion transport and membranes.
A biophysical outline
Butterworth,London(1971)

24 Hope, A.B.
Walker, N.A.
The physiology of giant algal cells
Cambridge University Press (1975)

25 Jeschke, W.D.
Über die Verwendung von ^{86}Rb als Indikator für Kalium, Untersuchungen am lichtgeförderten $^{42}K/K$-und $^{86}Rb/Rb$-Influx bei Elodea densa
Z.Naturforsch. 25 b, 624-630 (1970)

26 MacRobbie, E.A.C.
Ion fluxes to the vacuole of Nitella translucens
J.Exp.Bot. 20, 236-256 (1969)

27 MacRobbie, E.A.C.
Quantized fluxes of chloride to the vacuole of Nitella translucens
J.Exp.Bot. 21, 335-344 (197o)

28 MacRobbie, E.A.C.
Dainty, J.
Ion transport in Nitellopsis obtusa
J.Gen.Physiol. 42, 335-353 (1958)

29 MacRobbie, E.A.C.
Dainty, J.
Sodium and potassium distribution and Transport in the seaweed Rhodymenia palmata (L.)Grev.
Physiol.Plant. 11, 782-801 (1958)

30 Mummert, H.
Gradmann, D.
Voltage dependent potassium fluxes and the significance of action potentials in Acetabularia
Biochim.Biophys.Acta 443, 443-450 (1976)

31 Pallaghy, C.K.
Lüttge, U.
Willert, K.v.
Cytoplasmic compartmentation and parallel pathways of ion uptake in plant root cells
Z.Pflanzenphysiol. 62, 51-57 (1970)

32 Raven, J.A.
Transport in algal cells
in: Encyclopedia of plant Physiology, A.Pirson and M.H. Zimmermann eds.,Vol.2,Part A 129-188 (1976)

33 Rhoads, B.D.
Woo, A.
Epstein, W.
Discrimination between Rb^+ and K^+ by Escherichia coli
Biochim.Biophys.Acta 469, 45-51 (1977)

34 Saddler, H.D.W.
The ionic relations of Acetabularia mediterranea
J.Exp.Bot. 21, 345-359 (1970)

35 Saddler, H.D.W.
Fluxes of sodium and potassium in Acetabularia mediterranea
J.Exp.Bot. 21, 605-616 (1970)

36 Saddler, H.D.W.
The membrane potential of Acetabularia mediterranea
J.Gen.Physiol. 55, 802-821 (1970)

37 Saddler, H.D.W.
Spontaneous and induced changes in the membrane potential and resistance of Acetabularia mediterranea
J.Membrane Biol.5, 250-260 (1971)

38 Sauer, F.
Nonequilibrium thermodynamics of kidney tubule transport
in: Handbook of Physiology, R.W.Berliner, J.Orloff eds., Sect.8, Renal Physiology, 399-414 American Physiological Society (1973), Washington

39 Solomon, A.K.
Compartmental methods of kinetic analysis
in: Mineral metabolism. Vol 1,A, C.L.Comar and F.Bronner eds., Academic Press New York and London, Vol. 1,A 119-167 (1960)

40 Van Gansen, P.
Boloukhère-Presbourg, M.
Ultrastructur de l'algue unicellulaire Acetabularia mediterranea
J.Microscopie 4, 347-362 (1965)

41 West, K.R.
Pitman, M.G.
Rubidium as a tracer for potassium in the marine algae Ulva lactuca L. and Chaetomorpha darwinii (Hooker) Kuetzing
Nature 214, 1262 (1967)

Lebenslauf

Holger Mummert, geboren am 19.August 1948 in Barmstedt/Holst. als Sohn des Buchhalters Artur Hans Mummert und seiner Ehefrau Waltraud Mummert, geb. Blattner.

1955 - 1958	Grundschule in Barmstedt
1959	Grundschule in Ulm/Donau
1959 - 1965	Kepler-Gymnasium Ulm
1965 - 1967	Gymnasium Ebingen
20.06.1967	Reifeprüfung
1967 - 1969	Wehrdienst
SS 1969 - WS 1974/'75	Studium der Hauptfächer Biologie und Chemie an der Universität Tübingen
1974	Anfertigung einer Zulassungsarbeit mit dem Thema: "Korrelation von Ionenflüssen und elektrischen Eigenschaften der Membran von Acetabularia mediterranea"
3.03.1975	Staatsexamen in Biologie und Chemie
SS 1975 - WS 1978/'79	Arbeit an der vorliegenden Dissertation in der Abteilung Biophysik des Institutes für Biologie I der Universität Tübingen unter Anleitung von Herrn Privatdozent Dr. D.Gradmann.
	In der Zeit vom 1.05.1975 - 30.04.1977 wurde ich aus Mitteln der Deutschen Forschungsgemeinschaft unterstützt. Vom 1.05.1977 - 30.04.1979 erhielt ich ein Promotionsstipendium nach dem Graduiertenförderungsgesetz.

Meine akademischen Lehrer waren die Herren Professoren

Ammermann, Bentrup, Bünning, Grell, Hager, Kulzer, Mägdefrau, Möhres, Mörike, Müller, Rüdorff, Schwartz, Schweizer, Schwemmle, Seiler, Seyffert, Stegmann, Zetsche.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Gradmann, der die Anregung zu dieser Arbeit gegeben und mich nach Kräften unterstützt und angeleitet hat. Herrn Professor Dr. Bentrup danke ich dafür, daß ich die vorliegende Arbeit in den Räumen und mit den Mitteln der Abteilung Biophysik anfertigen durfte.

Ebenso danke ich allen Freunden und Kollegen für die Unterstützung, die sie mir zukommen ließen, besonders aber Frau Angelika Möricke, die es zu verhindern wußte, mich allzusehr mit der Algenanzucht zu beschäftigen. Die Originalzeichnungen zu dieser Arbeit hat Frau Verena Uhle für mich angefertigt.

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Acetabularia-Zellen verdanke ich Herrn Dr. C.Sautter, der sie mir großzügig zur Verfügung gestellt hat.